

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-41685

(P2000-41685A)

(43) 公開日 平成12年2月15日 (2000.2.15)

(51) IntCl.	識別記号	FI	キーワード (参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNAA
A01H 5/00		A01H 5/00	A
C12N 5/10		C12N 9/42	
9/42		C07K 14/415	
// C07K 14/415		C12N 5/00	C

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全24頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-77502

(22) 出願日 平成11年3月23日 (1999.3.23)

(31) 優先権主張番号 特願平10-166174

(32) 優先日 平成10年5月29日 (1998.5.29)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000122298

王子製紙株式会社

東京都中央区銀座4丁目7番5号

(71) 出願人 596175810

財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

千葉県木更津市矢野1532-3

(72) 発明者 柴田 大輔

茨城県つくば市千現2-1-6 つくば研

究支援センターD-21 株式会社三井薬

植物バイオ研究所内

(74) 代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物の細胞壁成分を改変する方法

(57) 【要約】

【課題】 植物の細胞壁合成に関与する酵素をコードする遺伝子を利用して、植物の細胞壁成分を改変することを課題とする。

【解決手段】 ポジショナルクローニングの手法を用いることにより、植物の細胞壁合成の異常をもたらすACW1変異の原因となる単一の遺伝子を広大な染色体領域において同定し、単離した。単離したACW1遺伝子の塩基配列を決定し、これと構造的に関連した遺伝子のデータベース検索を行った結果、ACW1遺伝子は、細胞壁分解酵素としてこれまで知られてきた植物の分泌型セルラーゼのホモログとして特徴づけられていた遺伝子と同一遺伝子であった。しかしながら、acw1変異体の細胞壁成分の解析を行った結果、驚くべきことに、ACW1遺伝子がコードするタンパク質が、細胞壁の分解というよりもむしろ合成に関わる機能を持つことを見出した。細胞壁の合成に関与するセルラーゼに関する報告は、これまでになされておらず、本発明者らは、このようなACW1タンパク質の性質から、ACW1遺伝子を利用することにより、植物の細胞壁成分を改変することが可能であることを見出した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物の細胞壁成分を改変するために用いる、下記(a)から(d)より選択されるDNA。

(a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失および/もしくは付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。

(c) 配列番号：2に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(d) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。

【請求項2】 植物の細胞壁成分がグルカン鎖である、請求項1に記載のDNA。

【請求項3】 請求項1における(a)から(d)より選択されるDNAを使用することを特徴とする、植物の細胞壁成分を改変する方法。

【請求項4】 植物の細胞壁成分がグルカン鎖である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 請求項1における(a)から(d)より選択されるDNAの導入および発現により、野生型の植物体と比較して、細胞壁成分が改変されている形質転換植物体。

【請求項6】 植物の細胞壁成分がグルカン鎖である、請求項5に記載の植物体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、植物の細胞壁合成に関与するセルラーゼ様タンパク質をコードする遺伝子を利用した植物の細胞壁成分の改変に関する。

【0002】

【従来の技術】 植物において細胞壁成分を改変することは、工業や農業の分野において、様々な重要な意義を有する。例えば、植物の細胞壁成分の改変は、セルロース・ヘミセルロース含量を高めることによるパルプ等繊維原材料植物や、有用な農作物および飼料作物の消化吸收効率の向上などをもたらす、経済性や収益性の点で有意義である。また、細胞壁成分である多糖の構造変化により、新たな産業的価値を有する原材料植物の作出をもたらすことも可能である。

【0003】 細胞壁およびそれに類する多糖成分の合成は、バクテリア・菌類・植物だけでなく動物でも行われている。細胞壁合成の分子レベルでの研究は、その産業的重要性にもかかわらず、あまり解析は行われていない。植物の細胞壁合成の分子レベルでの研究に関しては、近年、分子遺伝学的手法を用いて解析が行われはじ

めた。細胞壁合成に関与する遺伝子としては、これまでに例えば、セルロース合成酵素などが報告されている

(T. Arioli et al. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis. Science (1998) 279:717-720)。しかし、細胞壁合成に関わる遺伝子としては、いまだ単離されていない多くの遺伝子が存在すると考えられ、細胞壁合成に関しては未知の機構が存在すると考えられている(参考文献：Y. Kawagoe and D. P. Delmer, Pathway and genes involved in cellulose biosynthesis; Genetic engineering 19 Plenum Press, New York, 1997; K. Nishitani, Construction and Restructuring of the cellulose-xyloglucan framework in the apoplast as mediated by the xyloglucan-related protein family-A hypothetical scheme. J. Plant Res. 111:159-166, 1998)。

【0004】 一方、細胞壁を分解する酵素としては、セルラーゼが知られている。セルラーゼは、 β -1,4結合した多糖を分解する酵素(Endo β -1,4 glucanase)として、これまでにバクテリア・菌類・粘菌・植物などで報告されている(Beguin, P. Annu. Rev. Microbiol. 44, 219-248, 1990)。アミノ酸配列の疎水性解析から判別される活性部位から、6若しくはそれ以上のクラスに分けられることが示されている。それらのうち、植物のセルラーゼはEファミリーに属する(Beguin, P. Annu. Rev. Microbiol. 44, 219-248, 1990)。バクテリア等のEファミリーセルラーゼは、典型的なセルロース結合ドメインを保持しており、細胞外に分泌され結晶セルロースを分解することができる。バクテリア等は分解産物であるグルコースを栄養源にしている。

【0005】 高等植物のセルラーゼは、生長・発生・分化などに伴い、細胞自身の細胞壁の改変に関係しているといわれている(D. J. Cosgrove, How do plant cells extend? Plant Physiol. 102, 1-6, 1993)。そのため、セルラーゼは細胞外に分泌される必要があり、これまでに報告された植物のセルラーゼには、全て分泌のためのシグナルペプチドが存在する(Z. Shani, M. Deke, I. G. Tsabary and O. Shoseyov, Plant Mol. Biol. 34, 837-842, 1997; M. L. Tucker, R. Sexton, E. del Campillo and L. N. Lewis, Plant Physiol. 88:1257-1262, 1988)。

【0006】 植物の生長や分化時には、細胞壁の構造や性質などの変化が生じている。例えば、新たな細胞壁の合成や、既にある細胞壁多糖の修飾・再構築などが生じ、それにより細胞の大きさ、形、機能などが変化していく。これまでに植物のセルラーゼは、バックボーンとして β -1,4グルカン鎖をもつヘミセルロースもしくはセルロースを模範として機能すると示唆されている(Y.-S. Wong, G. B. Fincher and G. A. MacLachlan, J. Biol. Chem. 252, 1402-1407, 1977; T. Hayashi, Y.-S. Wong and G. A. MacLachlan, Plant Physiol. 75, 605-6

10, 1984)。しかしながら、結晶セルロースを分解するために必要なセルロース結合ドメインを保持していないなどの矛盾点が存在するため、植物中ではセルラーゼが実際に何を標的に機能しているかは明確にされておらず、バクテリア等のセルラーゼと比べ、高等植物での知見は非常に乏しい。

【0007】ところで本発明者らは、化学突然変異剤DM Sによって処理したシロイヌナズナの集団の中に、#66という検索番号が付与された、細胞や器官の形状が異常な突然変異体を見出した(平成8年8月25日 第7回シロイヌナズナワークショップ、平成9年3月27日 日本植物生理学会1997年度年会、平成9年11月13日 第8回シロイヌナズナワークショップ、平成10年5月3日 日本植物生理学会1998年度年会)。この突然変異はacw1 (altered cell wall 1) と名付けられ、この突然変異の原因となっている遺伝子がACW1遺伝子と命名された。しかしながら、ACW1遺伝子についてはいまだ単離されていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、植物の細胞壁合成に関与する酵素をコードする遺伝子を利用して、植物の細胞壁成分を改変することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ポジショナルクローニングの手法を用いることにより、植物の細胞壁合成の異常をもたらすACW1変異の原因となる単一の遺伝子を広大な染色体領域において同定し、単離することに成功した。本発明者らは、単離したACW1遺伝子の塩基配列を決定し、これと構造的に関連した遺伝子のデータベース検索を行い、ACW1遺伝子と同一遺伝子をデータベース上に見出した。この遺伝子は、細胞壁分解酵素としてこれまで知られてきた植物の分泌型セルラーゼのホモログとして特徴づけられていた。

【0010】しかしながら、本発明者らがacw1変異体の細胞壁成分につき種々の解析を行った結果、驚くべきことに、ACW1遺伝子がコードするタンパク質(以下、「ACW1タンパク質」と称する)が、細胞壁の分解というよりもむしろ合成に関わる機能を持つことを見出した。細胞壁の合成に関与するセルラーゼに関する報告は、これまでになされていない。本発明者らは、このようなACW1タンパク質の性質から、ACW1遺伝子を利用することにより、植物の細胞壁成分を改変することが可能であることを見出した。

【0011】本発明は、植物の細胞壁合成に関与するセルラーゼ様タンパク質をコードする遺伝子を利用した植物の細胞壁成分の改変に関し、より具体的には、(1)

植物の細胞壁成分を改変するために用いる、下記

(a) から (d) より選択されるDNA、

(a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、

(b) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列において1も

しくは複数のアミノ酸が置換、欠失および/もしくは付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA、

(c) 配列番号：2に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、

(d) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA、(2) 植物の細胞壁成分がグルカン鎖である、(1)に記載のDNA、(3)

(1)における(a)から(d)より選択されるDNAを使用することを特徴とする、植物の細胞壁成分を改変する方法、(4) 植物の細胞壁成分がグルカン鎖である、(3)に記載の方法、(5) (1)における(a)から(d)より選択されるDNAの導入および発現により、野生型の植物体と比較して、細胞壁成分が改変されている形質転換植物体、(6) 植物の細胞壁成分がグルカン鎖である、(5)に記載の植物体、に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明は、植物の細胞壁成分を改変するための、植物の細胞壁の合成に関与するセルラーゼ様タンパク質をコードするDNAの利用に関する。本発明における植物の細胞壁成分の改変は、具体的には、植物の細胞壁の合成に関与するセルラーゼ様タンパク質をコードするDNAを保持する形質転換植物体を作出することにより行う。細胞壁成分の改変に用いるDNAとしては、「ACW1」遺伝子が好ましい。本発明者らにより単離された「ACW1」遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号：2に、ゲノムDNAの塩基配列を配列番号：3に示す。

【0013】本発明の植物の細胞壁成分の改変においては、「ACW1」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードする限り、「ACW1」遺伝子以外のDNAを用いることも可能である。このようなDNAとしては、例えば、「ACW1」タンパク質のアミノ酸配列(配列番号：1)において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失および/もしくは付加したアミノ酸配列を有し、「ACW1」タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAが挙げられる。本発明において「機能的に同等」とは、タンパク質が植物の細胞壁合成、より具体的にはグルカン鎖の合成において機能することを指す。タンパク質が植物の細胞壁合成において機能するかどうかは、例えば、変異株において「ACW1」遺伝子を発現させることによる機能相補試験により、また「ACW1」遺伝子の発現制御や「ACW1」タンパク質の機能阻害による植物の細胞壁合成の変化、例えば、細胞壁成分の変化(非結晶グルカンの蓄積)、器官や細胞形態の変化として検出することが可能である。「ACW1」タンパク質のアミノ酸配列の人工的な改変は、例えば、変異や置換であれば「Transf

ormer Site-directed Mutagenesis Kit」や「ExSite PCR-Based Site-directed Mutagenesis Kit」(Clontech社製)を用いて行うことが可能であり、また、欠失であれば「Quantum leap Nested Deletion Kit」(Clontech社製)などを用いて行うことが可能である。アミノ酸の改変数は、通常、50アミノ酸以内であり、好ましくは30アミノ酸以内であり、さらに好ましくは10アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。また、アミノ酸の変異はこのような人工的なもののみならず、自然界においても生じることがある。

【0014】本発明者らは、acw1変異において、ACW1遺伝子の1355位の塩基グアニンのアデニンへの置換(それにより429位のアミノ酸グリシンからセリンへと置換される)が、温度感受性変異タンパク質(低温条件下では植物に野生型の表現系を付与するが、高温条件下では異常な表現系を付与する)を生じることを見出している(実施例1)。本発明においては、このように特定の温度下において「ACW1」と同等の機能を示すタンパク質も用いることが可能である。このようなタンパク質は温度調節により、機能を制御することができる点で有用である。

【0015】また、本発明においては、「ACW1」タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする限り、「ACW1」遺伝子の塩基配列と相同性を示す塩基配列を有する他の植物種由来のDNAを用いることも可能である。このようなDNAは、例えば、「ACW1」遺伝子の塩基配列の全部若しくは一部をプローブとしたハイブリダイゼーション技術(Southern 1975 J. Mol. Biol. 98:503; Maniatis et al. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press)により、また「ACW1」遺伝子に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCR技術(島本功、佐々木卓治 監修、「植物のPCR実験プロトコル」(細胞工学別冊、植物細胞工学シリーズ2)秀潤社 1995年4月10日発行)を利用して単離することができる。「機能的に同等」とは、上記と同様に、タンパク質が植物の細胞壁合成、より具体的にはグルカン鎖の合成において機能することを指す。ハイブリダイズ技術やPCR技術により得られるDNAは、「ACW1」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードする場合には、通常、「ACW1」遺伝子と高い相同性を有する。高い相同性とは、それぞれのDNAがコードするアミノ酸のレベルにおいて45%以上の相同性、好ましくは60%以上の相同性、さらに好ましくは75%以上の相同性、さらに好ましくは90%以上の相同性、さらに好ましくは95%以上の相同性を指す。このような遺伝子を単離するためのシロイヌナズナ以外の植物としては、例えば、イネ、トウモロコシ、ジャガイモ、タバコ、綿、アカシア、マツ、スギ、ユーカリ、ポプラなどが挙げられるが、これらに制限されない。

【0016】これらDNAを植物細胞内で発現させるため

には、(i)植物細胞で転写可能なプロモーター配列の下流に連結されたDNA分子と、(ii)必要に応じて該遺伝子の下流に連結された転写産物の安定化に必要なポリ(A)ニレーション部位を含むターミネーター配列、を含む発現カセットを植物細胞に導入する。

【0017】発現カセットは、挿入されているDNAを恒常的または誘導的に発現させるためのプロモーターを含有しうる。恒常的に発現させるためのプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター(Odell et al. 1985 Nature 313:810)、イネのグチンプロモーター(Zhang et al. 1991 Plant Cell 3:1155)、トウモロコシのユビキチンプロモーター(Cornejo et al. 1993 Plant Mol. Biol. 23:567)などが挙げられる。また、誘導的に発現させるためのプロモーターとしては、例えば糸状菌・細菌・ウイルスの感染や侵入、低温、高温、乾燥、紫外線の照射、特定の化合物の散布などの外因によって発現することが知られているプロモーターなどが挙げられる。このようなプロモーターとしては、例えば、糸状菌・細菌・ウイルスの感染や侵入によって発現するイネキチナーゼ遺伝子のプロモーター(Xu et al. 1996 Plant Mol. Biol. 30:387)やタバコのPRタンパク質遺伝子のプロモーター(Ohsima et al. 1990 Plant Cell 2:95)、低温によって誘導されるイネの「lip19」遺伝子のプロモーター(Aguan et al. 1993 Mol. Gen. Genet. 240:1)、高温によって誘導されるイネの「hsp80」遺伝子と「hsp72」遺伝子のプロモーター(Van Breusegem et al. 1994 Planta 193:57)、乾燥によって誘導されるシロイヌナズナの「rab16」遺伝子のプロモーター(Nundy et al. 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1406)、紫外線の照射によって誘導されるバセリのカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター(Schulze-Lefert et al. 1989 EMBO J. 8:651)、嫌気的条件下で誘導されるトウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター(Walker et al. 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6624)などが挙げられる。また、イネキチナーゼ遺伝子のプロモーターとタバコのPRタンパク質遺伝子のプロモーターはサリチル酸などの特定の化合物によって、「rab16」は植物ホルモンのアブシジン酸の散布によっても誘導される。

【0018】発現カセットが導入される植物細胞としては特に制限はない。細胞壁成分を改変することを望む植物体の細胞を用いることができる。例えば、シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシ、ジャガイモ、タバコ、綿、アカシア、マツ、スギ、ユーカリ、ポプラなどの細胞が挙げられる。発現カセットが導入される植物細胞としては、培養細胞の他、植物体中の細胞も含まれる。また、プロトプラスト、苗条原基、多芽体、毛状根も含まれる。植物細胞へのベクターの導入は、例えば、アグロバクテリウムを利用した導入方法(Hood et al. 1993 Transgenic Res. 2:218; Hiei et al. 1994 Plant J. 6:27

1)、エレクトロポレーション法 (Tada et al. 1990 Theor. Appl. Genet. 80:475)、ポリエチレングリコール法 (Lazzeriet al. 1991 Theor. Appl. Genet. 81:437)、パーティクルガン法 (Sanford et al. 1987 J. Part. Sci. tech. 5:27) など当業者に公知の種々の方法を用いることが可能である。

【0019】形質転換された植物細胞は、再生させることにより植物体を作出することができる。再生の方法は植物細胞の種類により異なるが、例えば、イネであれば Fujimura ら (Plant Tissue Culture Lett. 2:74 (1995)) の方法が挙げられ、トウモロコシであれば Shillito ら (Bio/Technology 7:581 (1989)) の方法や Gorden-Kamra ら (Plant Cell 2:603 (1990)) が挙げられ、ジャガイモであれば Visser ら (Theor. Appl. Genet. 78:594 (1989)) の方法が挙げられ、タバコであれば Nagata と Takebe (Planta 99:12 (1971)) の方法が挙げられ、シロイヌナズナであれば Akana ら (Plant Cell Reports 12:7-11 (1992)) の方法が挙げられる。これにより作出された植物体またはその繁殖媒体 (例えば、種子、塊茎、切穂など) から得た植物体は、野生型の植物体と比較して、本発明のタンパク質の発現が変化し、これにより細胞壁成分が改変される。「細胞壁成分の改変」としては、細胞壁成分の量的変化、質的变化および細胞形態の変化を含む。細胞壁成分としては、好ましくはグルカン鎖である。グルカン鎖の改変は、グルカンの重合度 (重合している糖の数) の調整 (グルカンの重合度には、例えば、針葉樹型、広葉樹型、双子葉型、単子葉型がある)、結晶化度 (グルカンが束ねられて形成される繊維の太さであり、繊維強度の決定要素である) の調整を含む。

【0020】植物における細胞壁成分の改変は、多くの利点を有する。細胞壁成分の増加は、例えば、植物の成長量の増加、パルプ等繊維原の増加をもたらすことができ、細胞壁成分の質的变化は、新素材の開発や飼料作物の消化吸収効率の増加をもたらすことができる。また細胞形態の変化は新たな美的価値を有する鑑賞用植物の作出などへ応用することも考えられる。

【0021】

【実施例】以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、DNAの切断、連結、大腸菌の形質転換、遺伝子の塩基配列決定、ハイブリダイゼーション等一般の遺伝子組換えに必要な方法は、各操作に使用する市販の試薬、機械装置等に添付されている説明書や、実験書 (例えば「Molecular cloning (Maniatis T. et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press)») に基本的に従った。また、シロイヌナズナの寒天培地や土壌を用いた育成、交配、ゲノムDNAの調製は実験書 (例えば「モデル植物の実験プロトコル (秀潤社)») に基本的に従った。

【0022】【実施例1】 ACW1遺伝子の単離

まず、ACW1遺伝子の染色体上の位置を決定するために、分子マーカーを用いてマッピングを行った。acw1 (altered cell wall 1) 変異体はシロイヌナズナのコロンビアエコタイプにおいて見出されているため、この変異体に、別のエコタイプであるランズバーク・エレクト種を交配し、次世代の種子を採種し、それを生育させ、自殖させてF2世代の種子を得た。このF2世代の種子を発芽させ、育成した植物 (830個体) からゲノムDNAを抽出した。これらのゲノムDNAを、マーカーとして自ら作製した「215.2.2」、「miP5-9.1.1」をそれぞれを用いて、同ゲノムDNAに対して、PCR法により組換え価を算出した。具体的には、「215.2.2」を増幅することができる2種類のPCRプライマー「配列番号: 4/5-TCAAATAGATATATGTAATATGTTTCGC-3」、「配列番号: 5/5-CAATAAATAATTATACAAACTTTCAG-3」を合成し、これらを用いて、F2世代のゲノムDNAをPCR法を用いて増幅させ、アガロース電気泳動で調べた。この分子マーカーでは、ランズバーク種は112bpにコロンビア種は110bpにバンドを示すため、これに基づいて計算したところ、ACW1遺伝子と同マーカーとの間には1染色体で組み換えが認められた。次に「miP5-9.1.1」を増幅することができる2種類のPCRプライマー「配列番号: 6/5-TACTTAATAAGTAGGATAATGTCG-3」、「配列番号: 7/5-GAATCATGAATTATGTTTACACTG-3」を合成し、これらを用いて、F2世代のゲノムDNAをPCR法を用いて増幅させ、アガロース電気泳動で調べた。この分子マーカーでは、ランズバーク種は87bpにコロンビア種は91bpにバンドを示すことが知られているため、これに基づいて計算したところ、ACW1遺伝子と同マーカーとの間には1染色体で組み換えが認められた。

【0023】以上のようにして、ACW1遺伝子を含む染色体上の領域が、「215.2.2」、「miP5-9.1.1」の2つの分子マーカーによって挟まれていることが確認された。そこで、分子マーカー「215.2.2」、「miP5-9.1.1」をそれぞれを含むゲノムDNA断片を単離して、遺伝子単離を進めることにした。具体的には、60-90kbpのシロイヌナズナコロンビア種のゲノムDNAで構成されるゲノムDNAライブラリー (約10000クローン) を「215.2.2」、「miP5-9.1.1」をプローブとしてスクリーニングし、「215.2.2」プローブで3つのクローン (TAC6M17、12J22、13F4と命名した) を、「miP5-9.1.1」プローブで2つのクローン (TAC15E4、9P8と命名した) を得た。「TAC15E4」の「left」側 («215.2.2」側) のDNA断片 (約600b) (この断片を「15E4-L」と称する) を、TAIL-PCR法 (植物のPCR実験プロトコル (秀潤社)) を用いて単離した。この際、TAIL-PCR法にはプライマーとしてL1、L2、L3、AD2を用いた。単離したDNA断片の塩基配列をもとに「15E4-L」を増幅することができる2種類のPCRプライマー「配列番号: 8/5-GCTTATAAATGGGTATAAAGCTATCAGC-3」、「配列番号: 9/5-TGCTTAATTCTCGGTAAACATTACCGG-3」を合成し、これらを用いて、ランズバーク種とコ

ロンビア種のゲノムDNAをPCR法を用いて増幅させ、塩基配列を解析したところ、ランズバグ種ではプライマー(配列番号:8)より96位の塩基配列がGに、コロンビア種ではTであることが認められ、このDNA断片は分子マーカーとして利用できることが判明した。そこで、ACW1遺伝子とこの新しいマーカーとの距離を、前述のF2植物で算出したところ、1660染色体間で、組み替えは見られなかった。

【0024】TACゲノムDNAライブラリーは、挿入されたDNA断片を直接、アグロバクテリウムを介して植物に遺伝子導入できるベクター(TACベクター)で作製されているので、TACGM17、12J22を胚軸カルストランスフォーメーション法を用いて、acw1変異体に遺伝子導入した。胚軸カルストランスフォーメーションは「Kazuhiro Akama, Hideaki Shiraiishi, Shozo Ohta, Kenzo Nakamura, Kiyotaka Okada, and Yoshiro Shimura: Efficient transformation of Arabidopsis thaliana: comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotype s, and Agrobacterium strains」(Plant Cell Reports (1992) 12:7-11)の方法に従い、また、アグロバクテリアとしてはMP90株を用いた。その結果2個体で野生型に表現型が回復した。つまり、この「TACGM17」、「12J22」クローンに含まれるゲノムDNA断片の重複する領域に、ACW1遺伝子が含まれることになる。

【0025】そこで、この領域のDNA断片の塩基配列を解析した。「215.1.1」マーカーと上記のDNA領域との間には、4つの遺伝子が存在することが予想された。そこで、この4つの仮想遺伝子の野生型の塩基配列を、acw1変異体に関して比較したところ、セルラーゼホモログとして登録されているcDNA(登録番号U37702)に相当する遺伝子領域において、突然変異が生じていることが判明した。この4個の遺伝子のなかでは、セルラーゼホモログのみが、acw1変異体において塩基配列の変異が認められることから、同遺伝子がACW1遺伝子であることが判明した。

【0026】ACW1遺伝子の全長cDNAを、λZAPII cDNAライブラリー(STRATAGENE社)より単離したところ、5個のイントロンが含まれていた。遺伝子からコードされるアミノ酸配列を解析したところ、セルラーゼに相同性が見られた。一般的に植物のセルラーゼは、菌類のセルラーゼが持つセルロース結合ドメインを持たない、膜外に分泌されるためのシグナル配列を持つなどの特徴があるが、インヒボで何を標的にしているかは明らかにされていない。ACW1遺伝子の産物もセルラーゼとして働いていると考えられる。しかしながら、①分子量が大きい(ACW1は69kD、他のほとんどは約54kD程度)、②シグナル配列を持っていない、③N末端側にチャージアミノ酸領域が存在する、④膜貫通ドメインを持つ、などの特徴から他のセルラーゼとは異なる新規のファミリーに属すると考えられる。

【0027】【実施例2】 acw1変異体の組織化学的解析 1/2B5培地に無菌播種して7日目の根および下胚軸を切り取り、それら試料を3%グルタルアルデヒド液中で4℃で固定した。試料をリン酸バッファー(pH7.0)で洗浄した(2~4℃)。なお、バッファーは10~20分間隔で4~6回入れ替えた。次いで、1% OsO₄・3% KMnO₄液で1~2時間固定し、その後上記リン酸バッファーで洗浄した。試料をアルコールシリーズ(30, 50, 70, 90, 99.5, 99.5, 99.5%エタノール)に各10~20分間浸し脱水を行った。試料をプロピレンオキシドに20分間隔で4回浸し、次いでエポキシ樹脂(Quetol 812)に3~6時間浸し浸透させた。試料を包埋用の型に入れ、エポキシ樹脂(Quetol 812)、硬化剤(DDSA)、加速剤(DMP-30)を加えた包埋用樹脂を注いだ。35℃の恒温器内に1日、次いで45℃の恒温器内に1日、次いで60℃の恒温器内に1日静置した。十分な硬化を確認後、45℃の恒温器内に数日~1週間静置した。型から試料を取り出し、電顕用ミクロトームで0.1μmの超薄切片サンプルを作製した。この超薄切片サンプルを、ウラニルアセテート・クエン酸鉛染色、もしくはPATAgで染色した後、透過型電子顕微鏡で観察した(前者はヘミセルロースやペクチンなどの非結晶の多糖を、後者は非結晶の糖を染色する作用を有する)。

【0028】この電子顕微鏡による組織化学的解析の結果、acw1変異体の根切片におけるウラニルアセテート・クエン酸鉛染色では非結晶グルカンの蓄積が認められた(図1B,C)が、野生型では認められなかった(図1A)。下胚軸切片においても同様の結果が得られた(図2)。また、根切片におけるPATAg染色においても、同様にacw1変異体のみ非結晶グルカンの蓄積が認められた(図3)。これらの非結晶性のグルカンは、本来より長いグルカン鎖へと転移され結晶化する。非結晶のグルカンが蓄積していることから、ACW1セルラーゼ遺伝子は、グルカン転移活性を持った新規セルラーゼであると考えられた。従来、分解活性の機能のみが予想されてきた高等植物のセルラーゼであるが、ACW1遺伝子産物は細胞壁の分解よりもむしろ合成に関わる機能を持つことが証明された。このようなセルラーゼは、ACW1遺伝子において他に報告例はない。

【0029】【実施例3】 acw1細胞壁成分の分析 21℃で2週間生育させた後、31℃で2週間生育させたacw1変異体の、地上部の細胞壁成分を調べた。細胞壁成分分析のための細胞壁粗精製サンプルの調製は、Zabackisらの方法(Zabackis et al, Plant Physiol, 107, 1129-1138(1995))に従った。まず、液体培地中で育った植物を乳鉢ですりつぶし、リン酸バッファー(pH7.0)を加え、これを遠心チューブにピペットで移した。ポリトロで破碎(130rpm, 45秒, 3回)した後、遠心(9,500rpm, 10分, 4℃)した。上清を捨てリン酸バッファーを加え、上記の破碎・遠心を再度行った。これをもう一度(計3回)繰り返した。沈殿を洗浄するため、蒸留水を

加え遠心 (9,500rpm, 10分, 4℃) した。これを計4回行った。70%エタノールを加え、よく懸濁し一晩 (4℃) 置いた。遠心して回収後、クロロフォルム/メタノール (1:1) 液を加えスターラーで撹拌した (30分)。遠心 (9,500rpm, 15分, 4℃) 後上清を捨て、もう一度クロロフォルム/メタノール (1:1) 抽出を行った。これらのクロロフォルム/メタノール (1:1) 抽出液は、濃縮エバポレーターで濃縮乾燥した (これを実施例5の薄層クロマトグラフィー等に用いた)。遠心回収後の沈殿にフェノール/酢酸/水 (2:1:1) を加え、スターラーで室温で1時間撹拌し、遠心 (9,500rpm, 15min, 4℃) した。これをもう一度繰り返した後、100%エタノールを加え、洗浄し、遠心した。さらに蒸留水で2回洗浄した後、アミラーゼ処理 (0.1M リン酸バッファー+ α -アミラーゼ 2mg/ml (Sigma社) *Aspergillus oryzae* 由来+トルエン5滴) を、48時間、緩やかに振とうしながら行った。遠心後、上清を捨て、蒸留水で5回洗浄した。最終的に回収した沈殿を細胞壁粗精製サンプルとした。これを-80℃で保存し、必要な量を解凍して分析に用いた。

【0030】このサンプルを用いて糖定量を行った。まず、調製した細胞壁サンプルを、適当量とり凍結乾燥させた。ガラス管に5mg取り取り、2Mのトリフルオロ酢酸 (TFA) を2.5ml (0.5ml TFA/1mg 細胞壁) 加え、オイルバス中で121℃で1時間インキュベートし、非結晶糖を加水分解した。室温まで自然冷却した後、遠心 (5,000rpm, 10分, 卓上遠心機) して上清と残渣 (沈殿) に分けた。残渣に蒸留水を加え、遠心して上清を取り、先に採取した上清に加えた。上清は、乾燥した後、蒸留水1mlに溶かし、糖定量を行った。残渣に72% H_2SO_4 を加え、室温で2時間静置した。途中で緩やかに撹拌し溶かした。蒸留水で35倍に希釈し沸騰水中で2時間煮沸し、完全に加水分解した。煮沸後、氷中に置き冷却し、メスシリンダーでメスアップし、糖定量を行った。糖定量は、全糖量をフェノール硫酸法で、ウロン酸量を α -ヒドロキシビフェニル法で行った。

【0031】その結果を図4に示す。TFA可溶性画分では、acw1変異体のグルコースの量 ($1790.0 \pm 86.4 \text{ nmol/mg}$ 細胞壁) は、wt (野生型) ($1907.6 \pm 158.4 \text{ nmol/mg}$ 細胞壁) とほぼ同じであった。しかし、TFA不溶画分では、acw1変異体のグルコースの量 ($436.7 \pm 20.0 \text{ nmol/mg}$ 細胞壁) は、wt ($1342.5 \pm 31.5 \text{ nmol/mg}$ 細胞壁) より少なかった。TFAに不溶なものは、結晶セルロースである。したがって、TFA不溶画分のグルコースは、セルロース由来である。この結果から、acw1変異体ではセルロースが減少していることが示された。acw1変異体のラムノースとウロン酸の量 (それぞれ 145.7 ± 7.0 , $659.6 \pm 31.7 \text{ nmol/mg}$ 細胞壁) は、wt (90.3 ± 7.5 , $441.6 \pm 9.7 \text{ nmol/mg}$ 細胞壁) より多かった。ラムノースとウロン酸が多いことから、ペクチン (Rhamnogalacturonan) が増加していることが示唆された。電顕観察で見られた染色性

の変化は、ペクチンの増加が原因であると思われる。TFAで分解される非結晶多糖は、ペクチンの増加が示唆された他は特に変化はなかった。

【0032】【実施例4】 セルロース繊維の観察
wtとacw1の細胞壁の、セルロース繊維の電子顕微鏡による観察の結果を図5に示す。実施例3において調製した細胞壁サンプルを2M TFAで加水分解した後の残さを電子顕微鏡で観察した。ペクチンやヘミセルロースなどの非結晶多糖は、2MTFA処理で分解されるので、残さのほとんどは結晶セルロースである。wtの繊維幅は約3.0nmであった。acw1のは約2.4nmで、wtよりも細くなっていた。セルロース繊維は、強酸処理をすると、マイクロフィブリルが膨潤したり、束になって非常に太くなって観察されることがある (図5、矢印)。wtで束になっている (17nm) ものが多く観察されたのは、強酸処理のためであると思われる。しかしながら、同様の処理をしたacw1では、束になっているものがあまり観察されなかった。また、太さも12nm程度であった。強酸処理のためマイクロフィブリルのnativeな状態を観察しているとはいえないが、処理後のマイクロフィブリルの状態には違いが生じていた。これは、wtとacw1の本来のマイクロフィブリルの性質の違いを反映していると思われる。

【0033】セルロースは、直鎖状の β -1,4-グルカンが束ねられて結晶化してできたものである。従って、その分子量を調べれば重合度がわかる。そこで、次に、セルロースの重合度を解析するためにその分子量の測定をゲル濾過分析により行った。測定に用いたセルロースサンプルは、Edashigeらの方法 (Edashige et al., Holzforshung, 49, 197-202 (1995)) で調製した。適当量の細胞壁粗精製サンプルを、0.05M DTA, 0.05M Na_2CO_3 , 1N KOH, 4N KOH, 4M KOH+3% ホウ酸塩の各液でシーケンシャルに抽出した。残渣 (結晶セルロース) を、あらかじめ用意しておいた発煙硝酸+酸化リン (V) 液でニトロ化した。吸引濾過して反応物 (ニトロセルロース) を集め、氷水にて洗浄した。再び吸引濾過してサンプルを集め、水を少し加え軽く煮沸した。さらに吸引濾過後、60℃で乾燥させた。ゲル濾過分析のため、サンプルをテトラヒドロフランに溶かし、シリンジで50 μ lインジェクトした。カラムは、Shimadzu LC-6Aを使用した。

【0034】その結果、マイクロフィブリルの重合度 (D.P.: degrees of polymerization) は、wtでは数百から5,000の広い範囲に分布がみられ (図6)、平均は約1,000であった。ところがacw1は分布が非常に狭くほぼ1ピークでみられ、平均は約5,000であった。

【0035】以上の事実から、ACW1遺伝子がセルロース合成に必要な遺伝子であり、この遺伝子の変異により、セルロースの量や質 (繊維幅、重合度etc.) などが変化するが示された。

【0036】【実施例5】 クロロフォルム/メタノール抽出層の解析

クロロフォルム/メタノール画分を、2M TFAで処理した後、薄層クロマトグラフィー(TLC)で解析した(図7)。薄層クロマトグラフィーにおいては、まず、実施例3で調製した乾固させたクロロフォルム/メタノール抽出層に、2M TFAを適量加え121℃で1時間インキュベートし、これを加水分解した。処理液を乾固させて、蒸留水とクロロフォルムを加えてよく攪拌し、遠心して上清(水層)を取り乾固した。再び蒸留水を適量加え、一部を薄層クロマトグラフィー用シリカプレートに、シリンジで展着させ溶媒(n-ブタノール/ピリジン/蒸留水=8:5:4)で展開した。展開後、プレートを乾燥させ、硫酸をスプレーしてホットプレートでインキュベートした。糖のスポットが黒く現れたら(現像)、ホットプレートからおろし自然冷却した。

【0037】この解析の結果、wtとacw1ともにガラクトースのスポットが観察された(図7レーン3および4)。これは、葉緑体膜を構成しているガラクトース脂質由来のものと考えられる。acw1ではグルコースのスポットもはっきりと観察された(図7レーン4矢印)。wtでは観察できなかった。

【0038】また、抽出物の成分を分析するために、アルディオールアセテート法によるガスクロマトグラフィー分析を行った。実施例3のクロロフォルム/メタノール抽出液の一部を乾固させ、水素化ホウ素ナトリウム(10mg/ml, NH₄OH中)液250μlに溶かし、1時間室温でインキュベートした。酢酸を2.3滴加えた後、酢酸/メタノール(1:9)を250μl加えた。ウォーターバス(40℃)で暖めながら乾固させた。これを計4回行った。さらにメタノールを250μl加え、同様に乾固させた。これも計4回行った。乾固したサンプルに、無水酢酸50μlとピリジン50μlを加え、オイルバス中で121℃で20分インキュベートし、アセチル化した。冷却後、トルエン200μlを加え乾固させる処理を2回行った。そして、ジクロロメタン500μlと蒸留水500μlを加えよく攪拌し、遠心して下層(ジクロロメタン層)を取り、乾固させた。適量のアセトンに溶かし、ガスクロマトグラフィー(Shimadzu GC14A SP2333カラム)にかけた。

【0039】TFA可溶層は、乾固したサンプルを上記の方法で処理すればよい。TFA残渣(硫酸加水分解)サンプルは、Ba(OH)₂で中和した後、濃縮したものを処理に用いた。

【0040】ガスクロマトグラフィー分析の結果、抽出物中にある糖はほとんどがガラクトースとグルコースであった。ガラクトースとグルコースモル比を調べた結果、wtはガラクトース 88.9mol(%)、グルコース11.1mol(%)、acw1はガラクトース 70.0mol(%)、グルコース30.0mol(%)であった。acw1のグルコース量は、wtと比べモル比で約3倍多くなっていた。

【0041】クロロフォルム/メタノール画分で増加しているグルコースは、グルカンであることが予想され

る。そこで、分子量分布をゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)解析で行った。wtとacw1それぞれのクロロフォルム/メタノール画分を、NaOHでケン化した後、解析した。

【0042】その結果、両方とも1, 3, 4, 6糖に相当するピークが得られた。wtの各ピークのエリア比は、36.1%, 14.8%, 28.4%, 20.7%であった。acw1の各ピークのエリア比は、26.9%, 15.2%, 30.0%, 27.9%であった。acw1ではwtに比べ、3, 4, 6糖の量が増えていた。6糖の増加が最も多く7.2%であった。ついで4糖で1.6%であった。増加しているグルコースは、4, 6糖のオリゴ糖として存在していることが予想された。

【0043】そこで、次ぎに予想されるグルコースのオリゴ糖の結合様式を、メチル化分析法で調べた。細胞壁粗精製サンプルを適量とり、DMSO 0.5mlを加えた。2時間室温で攪拌し、4M Na-DMSOを加え、さらに2時間攪拌した。反応液をトリフェニルメタンの粉末に少量つけて赤くなるのを確認し、水中におきヨウ化メチル50μlを加え1時間攪拌した。その後、蒸留水を0.5ml加え窒素ガスを吹き込んだ。反応液をSep-Pak C-18カラムにアプライし、100%アセトニトリル2mlと100%エタノール4mlでエリュージョンし、精製液を室温で乾固させた。2M TFAを250μl加え121℃で1時間加水分解し、反応液を乾固させ、イソプロパノール300μlを加え再び乾固した。さらに95%エタノール220μlとNaBD₄(NH₄OH中)200μlを加え、1時間室温で反応させた後、反応液に酢酸を2.3滴落とし、酢酸メタノールを250μl加え乾固させた。この処理をさらに4回繰り返した。メタノール250μlを加え乾固させる処理を3回繰り返した。次に、無水酢酸を50μl加え121℃で3時間反応(アセチル化)させ、室温に冷却後、蒸留水500μlを加え、Na₂CO₃を気泡がでなくなるまで加え、さらにジクロロメタンを500μl加えよく混合した。低速で遠心しジクロロメタン層をとり乾固させた。適量のアセトンに溶かし、ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC-MS)を行った。ガスクロマトグラフィー/質量分析には、Shimadzu QP-2000AおよびJEOL JMS-DX303を用いた。

【0044】その結果、ガラクトースは、ターミナル結合、2-結合、3-結合、4-結合、および6-結合が検出された。一方グルコースは、ターミナル結合および4-結合のみが検出された。アルカリケン化した抽出物をβ-1,4-グルカナーゼで処理すると、グルコース単糖がでてくる(データは示していない)。以上の結果から、acw1変異体では、グルコースがβ-1,4結合したオリゴ糖が、クロロフォルム/メタノール画分にwtより多く(約3倍)蓄積していることが明らかとなった。

【0045】これにより、グルコースがβ-1,4結合したオリゴ糖に、さらに脂質等が結合したものが、セルロース合成の基質となることが初めて明らかにされた。

【0046】

【発明の効果】本発明により、植物の細胞壁成分を改変するためのセルラーゼ様タンパク質をコードするDNAの利用が提供された。植物の細胞壁の改変は、例えば、パルプ等繊維原材料植物の供給効率の増加、細胞壁合成制御による新素材の開発、農作物の有用成分の増加、飼料作物の消化吸収効率の増加、細胞壁合成量増大による植

物の成長量の増加、細胞壁成分の改変に伴う細胞形態の変化による新たな美的価値を有する鑑賞用植物の作出などをもたらすことができるため、農業や工業・園芸の分野において有益である。

【0047】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>: Oji Paper Co., Ltd.

Kazusa DNA Research Institute

<120>: Method of modifying plant cell wall components

<130>: M2-005DP2

<140>:

<141>:

<150>: JP 10-166174

<151>: 1998-5-29

<160>: 9

<170>: PatentIn Ver. 2.0

<210>: 1

<211>: 621

<212>: PRT

<213>: Arabidopsis thaliana

<400>: 1

Met Tyr Gly Arg Asp Pro Trp Gly Gly Pro Leu Glu Ile Asn Thr Ala
1 5 10 15

Asp Ser Ala Thr Asp Asp Asp Arg Ser Arg Asn Leu Asn Asp Leu Asp
20 25 30

Arg Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Asp Glu Thr Gln Gln Ser Trp Leu
35 40 45

Leu Gly Pro Thr Glu Gln Lys Lys Lys Tyr Val Asp Leu Gly Cys
50 55 60

Ile Ile Val Ser Arg Lys Ile Phe Val Trp Thr Val Gly Thr Leu Val
65 70 75 80

Ala Ala Ala Leu Leu Ala Gly Phe Ile Thr Leu Ile Val Lys Thr Val
85 90 95

Pro Arg His His Pro Lys Thr Pro Pro Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Ala
100 105 110

Leu His Lys Ala Leu Lys Phe Phe Asn Ala Gln Lys Ser Gly Lys Leu
115 120 125

Pro Lys His Asn Asn Val Ser Trp Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gln Asp
130 135 140

Gly Lys Gly Glu Thr Gly Ser Phe Tyr Lys Asp Leu Val Gly Gly Tyr
145 150 155 160

Tyr Asp Ala Gly Asp Ala Ile Lys Phe Asn Phe Pro Met Ala Tyr Ala
165 170 175

Met Thr Met Leu Ser Trp Ser Val Ile Glu Tyr Ser Ala Lys Tyr Glu
180 185 190

Ala Ala Gly Glu Leu Thr His Val Lys Glu Leu Ile Lys Trp Gly Thr
195 200 205

Asp Tyr Phe Leu Lys Thr Phe Asn Ser Thr Ala Asp Ser Ile Asp Asp

210	215	220
Leu Val Ser Gln Val Gly Ser Gly Asn Thr Asp Asp Gly Asn Thr Asp		
225	230	235
Pro Asn Asp His Tyr Cys Trp Met Arg Pro Glu Asp Met Asp Tyr Lys		240
245	250	255
Arg Pro Val Thr Thr Cys Asn Gly Gly Cys Ser Asp Leu Ala Ala Glu		
260	265	270
Met Ala Ala Ala Leu Ala Ser Ala Ser Ile Val Phe Lys Asp Asn Lys		
275	280	285
Glu Tyr Ser Lys Lys Leu Val His Gly Ala Lys Val Val Tyr Gln Phe		
290	295	300
Gly Arg Thr Arg Arg Gly Arg Tyr Ser Ala Gly Thr Ala Glu Ser Ser		
305	310	315
Lys Phe Tyr Asn Ser Ser Met Tyr Trp Asp Glu Phe Ile Trp Gly Gly		
325	330	335
Ala Trp Met Tyr Tyr Ala Thr Gly Asn Val Thr Tyr Leu Asn Leu Ile		
340	345	350
Thr Gln Pro Thr Met Ala Lys His Ala Gly Ala Phe Trp Gly Gly Pro		
355	360	365
Tyr Tyr Gly Val Phe Ser Trp Asp Asn Lys Leu Ala Gly Ala Gln Leu		
370	375	380
Leu Leu Ser Arg Leu Arg Leu Phe Leu Ser Pro Gly Tyr Pro Tyr Glu		
385	390	395
Glu Ile Leu Arg Thr Phe His Asn Gln Thr Ser Ile Val Met Cys Ser		
405	410	415
Tyr Leu Pro Ile Phe Asn Lys Phe Asn Arg Thr Asn Gly Gly Leu Ile		
420	425	430
Glu Leu Asn His Gly Ala Pro Gln Pro Leu Gln Tyr Ser Val Asn Ala		
435	440	445
Ala Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Ser Asp Tyr Leu Asp Ala Ala Asp Thr		
450	455	460
Pro Gly Trp Tyr Cys Gly Pro Asn Phe Tyr Ser Thr Ser Val Leu Arg		
465	470	475
Asp Phe Ala Arg Ser Gln Ile Asp Tyr Ile Leu Gly Lys Asn Pro Arg		
485	490	495
Lys Met Ser Tyr Val Val Gly Phe Gly Thr Lys Tyr Pro Arg His Val		
500	505	510
His His Arg Gly Ala Ser Ile Pro Lys Asn Lys Val Lys Tyr Asn Cys		
515	520	525
Lys Gly Gly Trp Lys Trp Arg Asp Ser Lys Lys Pro Asn Pro Asn Thr		
530	535	540
Ile Glu Gly Ala Met Val Ala Gly Pro Asp Lys Arg Asp Gly Tyr Arg		
545	550	555
Asp Val Arg Met Asn Tyr Asn Tyr Thr Glu Pro Thr Leu Ala Gly Asn		
565	570	575
Ala Gly Leu Val Ala Ala Leu Val Ala Leu Ser Gly Glu Glu Glu Ala		
580	585	590
Thr Gly Lys Ile Asp Lys Asn Thr Ile Phe Ser Ala Val Pro Pro Leu		
595	600	605
Phe Pro Thr Pro Pro Pro Pro Ala Pro Trp Lys Pro		

610 615 620
 <:210>: 2
 <:211>: 2257
 <:212>: DNA
 <:213>: Arabidopsis thaliana
 <:220>:
 <:221>: CDS
 <:222>: (71).. (1933)
 <:400>: 2
 gcacgagatc tgatcccaaa cctttgattc attgttgttg ttctctgctg cttttatcaga 60
 gagcatcatc atg tac gga aga gat cca tgg gga ggt cca ttg gag ata 109
 Met Tyr Gly Arg Asp Pro Trp Gly Gly Pro Leu Glu Ile
 1 5 10
 aac act gca gat tcc gcc acc gac gat gat cgt agt cgg aat tta aac 157
 Asn Thr Ala Asp Ser Ala Thr Asp Asp Asp Arg Ser Arg Asn Leu Asn
 15 20 25
 gat ttg gat cgt gcg gct ctt tca cgt cca cta gat gag acg cag cag 205
 Asp Leu Asp Arg Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Asp Glu Thr Gln Gln
 30 35 40 45
 agt tgg tta ctt ggt cca acg gag cag aag aag aag aag tac gtc gat 253
 Ser Trp Leu Leu Gly Pro Thr Glu Gln Lys Lys Lys Lys Tyr Val Asp
 50 55 60
 ctc ggt tgt att atc gtt agc cgc aag atc ttc gtc tgg act gtt ggt 301
 Leu Gly Cys Ile Ile Val Ser Arg Lys Ile Phe Val Trp Thr Val Gly
 65 70 75
 act ctt gtt gcc gcc gcg tta ctc gcc gga ttc att acc ttg atc gtt 349
 Thr Leu Val Ala Ala Ala Leu Leu Ala Gly Phe Ile Thr Leu Ile Val
 80 85 90
 aaa act gtg ccg cgt cat cat cct aag act ccg ccg ccg gat aat tat 397
 Lys Thr Val Pro Arg His His Pro Lys Thr Pro Pro Pro Asp Asn Tyr
 95 100 105
 act ata gct cta cac aaa gct ctt aag ttc ttc aat gct cag aaa tct 445
 Thr Ile Ala Leu His Lys Ala Leu Lys Phe Phe Asn Ala Gln Lys Ser
 110 115 120 125
 ggg aaa ttg cca aag cat aat aac gtg tca tgg aga ggt aat tct ggg 493
 Gly Lys Leu Pro Lys His Asn Asn Val Ser Trp Arg Gly Asn Ser Gly
 130 135 140
 ctt caa gat ggg aaa ggt gaa aca gga agc ttc tat aaa gat ttg gts 541
 Leu Gln Asp Gly Lys Gly Glu Thr Gly Ser Phe Tyr Lys Asp Leu Val
 145 150 155
 gga ggt tat tat gat gct ggt gat gct atc aag ttc aat ttc ccc atg 589
 Gly Gly Tyr Tyr Asp Ala Gly Asp Ala Ile Lys Phe Asn Phe Pro Met
 160 165 170
 gct tat gct atg act atg ttg agc tgg agt gtt att gaa tat agt gct 637
 Ala Tyr Ala Met Thr Met Leu Ser Trp Ser Val Ile Glu Tyr Ser Ala
 175 180 185
 aaa tac gaa gct gct ggt gag ctc act cat gtt aag gag ctt atc aaa 685
 Lys Tyr Glu Ala Ala Gly Glu Leu Thr His Val Lys Glu Leu Ile Lys
 190 195 200 205
 tgg gga act gat tac ttt ctc aag act ttc aat agt act gct gat tcc 733

Trp Gly Thr Asp Tyr Phe Leu Lys Thr Phe Asn Ser Thr Ala Asp Ser	
210 215 220	
att gat gat ctt gtg tca cag gtt gga tca ggg aat act gat gat gga	781
Ile Asp Asp Leu Val Ser Gln Val Gly Ser Gly Asn Thr Asp Asp Gly	
225 230 235	
aat aca gat cct aat gac cat tac tgt tgg atg cga cct gag gat atg	829
Asn Thr Asp Pro Asn Asp His Tyr Cys Trp Met Arg Pro Glu Asp Met	
240 245 250	
gac tat aaa agg ccc gtg act act tgt aat ggt gga tgt tgg gat ctc	877
Asp Tyr Lys Arg Pro Val Thr Thr Cys Asn Gly Gly Cys Ser Asp Leu	
255 260 265	
gct gca gag atg gca gct gct ctg gct tca gca tct att gta ttc aag	925
Ala Ala Glu Met Ala Ala Ala Leu Ala Ser Ala Ser Ile Val Phe Lys	
270 275 280 285	
gat aac aag gaa tat tct aaa aag ctt gtc cat ggt gct aag gtg gtg	973
Asp Asn Lys Glu Tyr Ser Lys Lys Leu Val His Gly Ala Lys Val Val	
290 295 300	
tat cag ttt gga agg acg agg aga ggg aga tat agt gca ggc act gcg	1021
Tyr Gln Phe Gly Arg Thr Arg Arg Gly Arg Tyr Ser Ala Gly Thr Ala	
305 310 315	
gaa tct agc aag ttc tat aat tca agt atg tat tgg gat gag ttc att	1069
Glu Ser Ser Lys Phe Tyr Asn Ser Ser Met Tyr Trp Asp Glu Phe Ile	
320 325 330	
tgg ggt ggt gct tgg atg tat tat gct acc gga aat gta acg tat ctc	1117
Trp Gly Gly Ala Trp Met Tyr Tyr Ala Thr Gly Asn Val Thr Tyr Leu	
335 340 345	
aat cta atc acc caa cct act atg gcc aag cat gct ggt gcc ttc tgg	1165
Asn Leu Ile Thr Gln Pro Thr Met Ala Lys His Ala Gly Ala Phe Trp	
350 355 360 365	
ggt ggc cct tac tat ggt gta ttt agc tgg gac aac aag ctt gct ggt	1213
Gly Gly Pro Tyr Tyr Gly Val Phe Ser Trp Asp Asn Lys Leu Ala Gly	
370 375 380	
gct cag ttg ctg ttg agc cgg ttg agg ttg ttt ctg agt cct gga tat	1261
Ala Gln Leu Leu Leu Ser Arg Leu Arg Leu Phe Leu Ser Pro Gly Tyr	
385 390 395	
cca tat gaa gaa att cta agg acc ttc cac aat cag acc agc ata gtc	1309
Pro Tyr Glu Glu Ile Leu Arg Thr Phe His Asn Gln Thr Ser Ile Val	
400 405 410	
atg tgc tca tac ttg cct att ttc aac aaa ttt aac aga acc aat gga	1357
Met Cys Ser Tyr Leu Pro Ile Phe Asn Lys Phe Asn Arg Thr Asn Gly	
415 420 425	
ggt tta ata gag ttg aat cat gga gct cca cag ccg ctg caa tat tct	1405
Gly Leu Ile Glu Leu Asn His Gly Ala Pro Gln Pro Leu Gln Tyr Ser	
430 435 440 445	
gta aat gca gct ttc tta gcg act cta tac agt gat tat ctg gat gct	1453
Val Asn Ala Ala Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Ser Asp Tyr Leu Asp Ala	
450 455 460	
gct gat act cct gga tgg tac tgt gga cct aat ttc tat tgg aca agt	1501
Ala Asp Thr Pro Gly Trp Tyr Cys Gly Pro Asn Phe Tyr Ser Thr Ser	

465 470 475
 gtg cta cgt gac ttt gct aga tcc cag att gat tat ata ctg ggt aaa 1549
 Val Leu Arg Asp Phe Ala Arg Ser Gln Ile Asp Tyr Ile Leu Gly Lys
 480 485 490
 aac cct cgg aaa atg agt tat gtc gtt ggt ttt ggc aca aaa tac cca 1597
 Asn Pro Arg Lys Met Ser Tyr Val Val Gly Phe Gly Thr Lys Tyr Pro
 495 500 505
 aga cat gtg cat cac aga gga gct tcg ata ccc aag aac aaa gtc aag 1645
 Arg His Val His His Arg Gly Ala Ser Ile Pro Lys Asn Lys Val Lys
 510 515 520 525
 tat aac tgc aaa gga gga tgg aaa tgg aga gac agc aag aaa cca aac 1693
 Tyr Asn Cys Lys Gly Gly Trp Lys Trp Arg Asp Ser Lys Lys Pro Asn
 530 535 540
 cca aac acg att gaa gga gcc atg gtt gct ggt cct gac aag cgc gac 1741
 Pro Asn Thr Ile Glu Gly Ala Met Val Ala Gly Pro Asp Lys Arg Asp
 545 550 555
 ggg tac cgt gat gtc cgt atg aac tac aac tac act gaa ccg act ctt 1789
 Gly Tyr Arg Asp Val Arg Met Asn Tyr Asn Tyr Thr Glu Pro Thr Leu
 560 565 570
 gca ggc aat gct ggt cta gtc gca gct ctt gtg gca tta tgg ggt gaa 1837
 Ala Gly Asn Ala Gly Leu Val Ala Ala Leu Val Ala Leu Ser Gly Glu
 575 580 585
 gaa gaa gcc acc ggt aag ata gac aaa aac act att ttc tca gct gtt 1885
 Glu Glu Ala Thr Gly Lys Ile Asp Lys Asn Thr Ile Phe Ser Ala Val
 590 595 600 605
 cct cct ttg ttc cct act cca cca cct cca cca gca cca tgg aaa cct 1933
 Pro Pro Leu Phe Pro Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Trp Lys Pro
 610 615 620
 tgagaaagct agacttctgt gattctctcg ctgctgccaa aaaaaatgaa ttaggtaaga 1993
 aggatttggg tctgagacca gaagattaga agctaaacac aagtcagcca taaccaaact 2053
 actaaggatt tcatttgct ttactagata caaacacggg gtgggttact ttaccacaag 2113
 cattgtcttt cttttcttt ttgggttgc tgtttgttc ttgtgagata tcatatatat 2173
 ctatcgcttt tactctgtat atgtttgata ccaacttct attctttgat aaacaattta 2233
 atgaactgta ttaactttt aact 2257

<:210>: 3

<:211>: 12319

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:220>:

<:221>: exon

<:222>: (3447)..(3819)

<:220>:

<:221>: exon

<:222>: (3898)..(4208)

<:220>:

<:221>: exon

<:222>: (4282)..(4746)

<:220>:

<:221>: exon

<:222>: (4863)..(4998)

<:220>:

<:221>: exon

<:222>: (5100)..(5272)

<:220>:

<:221>: exon

<:222>: (5443)..(5850)

<:400>: 3

ctcgagaggt tccattcttc tccgtcttat cgaatccct ttgaaacatg ctacaagata	60
tcaigtgttg cttggtcata tcaccatggc ttctctctcc ttacatggcc tctgttatgt	120
tgttgatgg atcattcaag gtcaactttt agagcttgta agatcctaca acatcattga	180
atcttgacat aatagtatag cctagtittat ctactatagt atagtgtcga tcatcggttc	240
aagataggtc tatactctat aagtcacaat ttatctctct tattttctat tgtaaagttt	300
catcatcacc aactacttac tctctcaga tattttcatg gaatgctatc ggaattgcta	360
tcttaccgg agttatcagt ctagtggcgg gtttactgat gtgggtcaca tcgcttcaca	420
ccgtgagaaa gaattacttt gagctctct tctacacaca tcaactatac atcgcttita	480
ttgtgttctt ggcacttcat gtgtgtgatt acatgtttag tatagttget ggaggaatat	540
ttcttttcat tctagaccgc ttcttgaggt tctgccaatc aagaaggact gtgatgtaa	600
tctctgcaaa gagtttacct tgtggaactc ttgaactagt cctttcaaaa ccaccaagta	660
acaactctgt ttatctctg tttttacct ctaactaaa acatttactg actttttct	720
tcttcaatac cgcataaac agatagcga tacaatggc ttagctttat ctttcttcaa	780
gtgagggaac tatcttggtt acaatggcat ccatitagtg ttcttcaag cctcttagat	840
gggaaccatc atgttgcgtt tctcataaag gtcttgggtg gatggactgc aaagcttaga	900
gaccagtgtt caaatctata cgaagcagag aaccaagatc agctcatttc tctcagtc	960
tatcttaaaa tcacaacttg tgtggagga ccttatggcc atgaatctcc ataccattta	1020
gcgtaatgca ttctgtctac ttgaaatttt ttcaatgcca taagcttiag ctttaactca	1080
gaaagattta ttgcgggtgc aggtatgaga accgtgtctt agtagcagga ggaatcgga	1140
ttacgccttt ttctgcatc ttaagcgata tctacaccg taaaagagat gggaaagctt	1200
gtttacctag taaggtttta gtgttatggg ccattaaaaa ctacagcag ctctctctgc	1260
tctcagcaat tgacatacct tccatttgc cttctctctc taagaaacta aaccttgaga	1320
ttcacatata tatcactcga caatccgagc ctgcttgggt acgtctttaa taagctttt	1380
ggagcttga ataggctta ctaagcttgt tgaactcttt aatgtttcat ggttatagag	1440
gaagatggga tggttcaca ggtgtgcat ccttctgtca agctaccacg gaccaacgga	1500
tgttctatgt cgttactagt tggtagcagg gataacatat ggtctggact ctatctaatt	1560
ataccacca ttgatttat ttcaatgac acattgttgg acatctttta cataaaaaga	1620
tacaacataa caacgtggig gtacaaggga ctctattttg ttggttgat ggttgaagt	1680
gtcttgattt ttgaggtct tctgttgtt ttctggcatc gctgggaaca caaaaccgtt	1740
gaagtggag caaatggcaa cgaacaagta gattgaatg gagaagaac ccaatacca	1800
tctgcagcag agcttaaggc ctggcaata gaagaagatg tccagaattt caccactatt	1860
cgttatggca ccagaccggc ctttagaggt atacatata aaattagcgg tctcaagtc	1920
agttatctcg ttttttatt tataaaatta tagaaactga aatcattcgg aacggttga	1980
cacggtttcg ttccgttctt gaatccgact ttgtgttag atatttggct cgattcgtt	2040
aagttaaate ttgatgtgt tcatgtaata tttttttt gtaattgag agatattga	2100
gtcatigaaat gggaatggg ggagtgtga tgttgagtg atagtatgc gtccagcag	2160
tcttcagacg accgtagcca aagaatacag gtcacatagc atctgggat cgcgaatca	2220
tctcttttc cacttcaaca gccacagttt cgaatcttaa cgaatcttc aaggccaaag	2280
aacattatgg aaggaaattc gaagacaaat tgatgcatat atttaggta atctctgtca	2340
gtatgtacta tggaaacagc tatgttgat atgtgtatgt ttatctttca gttttcag	2400
tataaagtag aaatcaaatg tatgagcatc tatgtttct agttctacac ttgttggt	2460

ttctacattg gacatttaatt attaattaaa tgcaagctga taagtcttat aattacatag	2520
ctgcccatat attttcggaa ttttttaaa tagagatata ttcatatata tatgaggat	2580
tagattctat aattacgaat gtatttaatt tcaaatata agttagattc tcataattct	2640
ccttacttac tctgtgagg attagagtcg taaaaatgac cacaagatgt aattttttt	2700
taggtcattg atctaccatc aattgtcgg acacacttat cttataagtt ttaaatttta	2760
acaaatgtaa gtgaaatttt gtgtagact atcattttca agtagaagta gaatttaagt	2820
aaccttccct gttataattt ttttttaaaa attatgtcat tacttagagc ccaccagaaa	2880
tgatgacgtg taaaacacca taatcataaa ggataaata aaattatcat cccaccgaca	2940
gtttattagc ggagatgtct ttttccatcc acccgacatt agccattgc tttactagta	3000
aacaaagtat atgcaatttt ttgtagaaa aaacgggtga taaaaataa tattttaatg	3060
ttctccgaaa attttaattg tatgaaaaat aaatacacia gattacaagt tgccaaaac	3120
gtcacaatcat agttgcccac aaatafacta ttccaaaatt agagttagct gtaacgtaac	3180
atgtacaaat aaaccaaaaca aaacatataa taacaaaata attgaagtga gtittaaaaa	3240
ggaaaaaaa aaaagagtaa aaaaccaaaa ccagatctct caaagagctt ttgtacatta	3300
ttgactagag agagcttttt agcttcacat ttcttcaatt ccacacactt ttacttctt	3360
ctctctcttc ttctctctc cagatctgat cccaaacctt tgattcattg ttgttcttct	3420
ctgtctctt atcagagagc atcacc atg tac gga aga gat cca tgg gga ggt	3473
Met Tyr Gly Arg Asp Pro Trp Gly Gly	
1 5	
cca ttg gag ata aac act gca gat tcc gcc acc gac gat gat cgt agt	3521
Pro Leu Glu Ile Asn Thr Ala Asp Ser Ala Thr Asp Asp Asp Arg Ser	
10 15 20 25	
cgg aat tta aac gat ttg gat cgt gcg gct ctt tca cgt cca cta gat	3569
Arg Asn Leu Asn Asp Leu Asp Arg Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Asp	
30 35 40	
gag acg cag cag agt tgg tta ctt ggt cca acg gag cag aag aag aag	3617
Glu Thr Gln Gln Ser Trp Leu Leu Gly Pro Thr Glu Gln Lys Lys Lys	
45 50 55	
aag tac gtc gat ctc ggt tgt att atc gtt agc cgc aag atc ttc gtc	3665
Lys Tyr Val Asp Leu Gly Cys Ile Ile Val Ser Arg Lys Ile Phe Val	
60 65 70	
tgg act gtt ggt act ctt gtt gcc gcc gcg tta ctc gcc gga ttc att	3713
Trp Thr Val Gly Thr Leu Val Ala Ala Ala Leu Leu Ala Gly Phe Ile	
75 80 85	
acc ttg atc gtt aaa act gtg ccg cgt cat cat cct aag act ccg ccg	3761
Thr Leu Ile Val Lys Thr Val Pro Arg His His Pro Lys Thr Pro Pro	
90 95 100 105	
ccg gat aat tat act ata gct cta cac aaa gct ctt aag ttc ttc aat	3809
Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Ala Leu His Lys Ala Leu Lys Phe Phe Asn	
110 115 120	
gct cag aaa t gtaagttag aatctactta gatctgataa aatttagata ta	3861
Ala Gln Lys	
gagttttaga tctaagtctg attttgattg ttgtag ct ggg aaa ttg cca aag	3914
Ser Gly Lys Leu Pro Lys	
125 130	
cat aat aac gtg tca tgg aga ggt aat tct ggg ctt caa gat ggg aaa	3962
His Asn Asn Val Ser Trp Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gln Asp Gly Lys	
135 140 145	

ggt gaa aca gga agc ttc tat aaa gat ttg gtg gga ggt tat tat gat 4010
 Gly Glu Thr Gly Ser Phe Tyr Lys Asp Leu Val Gly Gly Tyr Tyr Asp
 150 155 160
 gct ggt gat gct atc aag ttc aat ttc ccc atg gct tat gct atg act 4058
 Ala Gly Asp Ala Ile Lys Phe Asn Phe Pro Met Ala Tyr Ala Met Thr
 165 170 175
 atg ttg agc tgg agt gtt att gaa tat agt gct aaa tac gaa gct gct 4106
 Met Leu Ser Trp Ser Val Ile Glu Tyr Ser Ala Lys Tyr Glu Ala Ala
 180 185 190
 ggt gag ctc act cat gtt aag gag ctt atc aaa tgg gga act gat tac 4154
 Gly Glu Leu Thr His Val Lys Glu Leu Ile Lys Trp Gly Thr Asp Tyr
 195 200 205 210
 ttt ctc aag act ttc aat agt act gct gat tcc att gat gat ctt gtg 4202
 Phe Leu Lys Thr Phe Asn Ser Thr Ala Asp Ser Ile Asp Asp Leu Val
 215 220 225
 tca cag gtacttggtt atgaccttcg taggagatct ttcattatga gtgttgttt 4258
 Ser Gln
 cactcggtac atgtttaatg tag gtt gga tca ggg aat act gat gat gga aat 4311
 Val Gly Ser Gly Asn Thr Asp Asp Gly Asn
 230 235
 aca gat cct aat gac cat tac tgt tgg atg cga cct gag gat atg gac 4359
 Thr Asp Pro Asn Asp His Tyr Cys Trp Met Arg Pro Glu Asp Met Asp
 240 245 250
 tat aaa agg ccc gtg act act tgt aat ggt gga tgt tgg gat ctc gct 4407
 Tyr Lys Arg Pro Val Thr Thr Cys Asn Gly Gly Cys Ser Asp Leu Ala
 255 260 265 270
 gca gag atg gca gct gct ctg gct tca gca tct att gta ttc aag gat 4455
 Ala Glu Met Ala Ala Ala Leu Ala Ser Ala Ser Ile Val Phe Lys Asp
 275 280 285
 aac aag gaa tat tct aaa aag ctt gtc cat ggt gct aag gtg gtg tat 4503
 Asn Lys Glu Tyr Ser Lys Lys Leu Val His Gly Ala Lys Val Val Tyr
 290 295 300
 cag ttt gga agg acg agg aga ggg aga tat agt gca ggc act gcg gaa 4551
 Gln Phe Gly Arg Thr Arg Arg Gly Arg Tyr Ser Ala Gly Thr Ala Glu
 305 310 315
 tct agc aag ttc tat aat tca agt atg tat tgg gat gag ttc att tgg 4599
 Ser Ser Lys Phe Tyr Asn Ser Ser Met Tyr Trp Asp Glu Phe Ile Trp
 320 325 330
 ggt ggt gct tgg atg tat tat gct acc gga aat gta acg tat ctc aat 4647
 Gly Gly Ala Trp Met Tyr Tyr Ala Thr Gly Asn Val Thr Tyr Leu Asn
 335 340 345 350
 cta atc acc caa cct act atg gcc aag cat gct ggt gcc ttc tgg ggt 4695
 Leu Ile Thr Gln Pro Thr Met Ala Lys His Ala Gly Ala Phe Trp Gly
 355 360 365
 ggc cct tac tat ggt gta ttt agc tgg gac aac aag ctt gct ggt gct 4743
 Gly Pro Tyr Tyr Gly Val Phe Ser Trp Asp Asn Lys Leu Ala Gly Ala
 370 375 380
 cag gtacgtccac acataacaac ctgctgtgtt tatgtttctt agatattcat 4796
 Gln

gtctcttga tcatttgect taaccatact actcttgact cttttgaatc ccttttgca 4856
 ttttag ttg ctg ttg agc cgg ttg agg ttg ttt ctg agt cct gga tat 4904
 Leu Leu Leu Ser Arg Leu Arg Leu Phe Leu Ser Pro Gly Tyr
 385 390 395
 cca tat gaa gaa att cta agg acc ttc cac aat cag acc agc ata gtc 4952
 Pro Tyr Glu Glu Ile Leu Arg Thr Phe His Asn Gln Thr Ser Ile Val
 400 405 410
 atg tgc tca tac ttg cct att ttc aac aaa ttt aac aga acc aat g gt 5000
 Met Cys Ser Tyr Leu Pro Ile Phe Asn Lys Phe Asn Arg Thr Asn
 415 420 425
 tagttacctt ccagctttaa tgcctgcctc taataaaact ccaactgtg-gccttgtct 5060
 tgttcagat atctaaaatg aaatctttgg tatgtgcag ga ggt tta ata gag ttg 5116
 Gly Gly Leu Ile Glu Leu
 430
 aat cat gga gct cca cag ccg ctg caa tat tct gta aat gca gct ttc 5164
 Asn His Gly Ala Pro Gln Pro Leu Gln Tyr Ser Val Asn Ala Ala Phe
 435 440 445 450
 tta gcg act cta tac agt gat tat ctg gat gct gct gat act cct gga 5212
 Leu Ala Thr Leu Tyr Ser Asp Tyr Leu Asp Ala Ala Asp Thr Pro Gly
 455 460 465
 tgg tac tgt gga cct aat ttc tat tgc aca agt gtc cta cgt gac ttt 5260
 Trp Tyr Cys Gly Pro Asn Phe Tyr Ser Thr Ser Val Leu Arg Asp Phe
 470 475 480
 gct aga tcc cag gtattgttc ttttcttta ctctttacag aaatgtaat 5312
 Ala Arg Ser Gln
 485
 ctccagatata gtaatggata agatccaaaa atgacacttt taaccaagat tgaacgaaga 5372
 tctttttaaa ctccattttt tatittgaca tctaaattgg atttaactcg gccttgcgt 5432
 attttgcag att gat tat ata ctg ggt aaa aac cct cgg aaa atg agt 5481
 Ile Asp Tyr Ile Leu Gly Lys Asn Pro Arg Lys Met Ser
 490 495
 tat gtc gtt ggt ttt ggc aca aaa tac cca aga cat gtc cat cac aga 5529
 Tyr Val Val Gly Phe Gly Thr Lys Tyr Pro Arg His Val His His Arg
 500 505 510 515
 gga gct tgc ata ccc aag aac aaa gtc aag tat aac tgc aaa gga gga 5571
 Gly Ala Ser Ile Pro Lys Asn Lys Val Lys Tyr Asn Cys Lys Gly Gly
 520 525 530
 tgg aaa tgg aga gac agc aag aaa cca aac cca aac acg att gaa gga 5625
 Trp Lys Trp Arg Asp Ser Lys Lys Pro Asn Pro Asn Thr Ile Glu Gly
 535 540 545
 gcc atg gtt gct ggt cct gac aag cgc gac ggg tac cgt gat gtc cgt 5673
 Ala Met Val Ala Gly Pro Asp Lys Arg Asp Gly Tyr Arg Asp Val Arg
 550 555 560
 atg aac tac aac tac act gaa ccg act ctt gca ggc aat gct ggt cta 5721
 Met Asn Tyr Asn Tyr Thr Glu Pro Thr Leu Ala Gly Asn Ala Gly Leu
 565 570 575
 gtc gca gct ctt gtg gca tta tgc ggt gaa gaa gaa gcc acc ggt aag 5769
 Val Ala Ala Leu Val Ala Leu Ser Gly Glu Glu Glu Ala Thr Gly Lys

580	585	590	595	
ata gac aaa aac act att ttc tca gct gtt cct cct ttg ttc cct act				5817
Ile Asp Lys Asn Thr Ile Phe Ser Ala Val Pro Pro Leu Phe Pro Thr				
600	605	610		
cca cca cct cca cca gca cca tgg aaa cct tgagaaagct agacttgtgt				5867
Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Trp Lys Pro				
615	620			
gattctgtcg ctgctgccaa aaaaaatgaa tgaggaaga aggatttggg tgtgagacca				5927
gaagattaga agctaaacac aagtcagcca taaccaaact actaaggatt tcatttggct				5987
ttactagata caaacacggg gtgggttact ttaccacaag cattgtcttt cttttctttt				6047
tttgggttgc tgtttgttc ttgtgagata tcatatata ctatgcgttt tactctgtat				6107
atgtttgata ccaaacttgt attctttgat aaacaattta atgaactgta ttaaactttt				6167
aactatgttt tattgtgcaa gtgtgagatc aacctggaat aacaactgta gtctactaaa				6227
atagctgatt ctagcatgca tttaactcatt taatggatat aaacgatgat gcagaaagaa				6287
tattgcagta aagaacggaa ttacatatgg cattctttat acatgatgaa gttgtattca				6347
cagatgcat ggagaaacc aaattaaact gttaacacag tacacagcgg agatgtgttc				6407
gagaagcgt catcgtcaat caaacgagct tcatattac atgacatgac gcccaaaagg				6467
cctttgatgc aacctcagg atcacgggt ttgatagat cctgtcgtg aaatgaacaa				6527
aataaaatg ctgttgaga acgataaaca atggactat tagattttgc aatgtagaag				6587
atgactagat gatattatc ctataacag ttgcgtcca tgacgtacg ttgtaagcaa				6647
ccttacttcc atcccagct ttccgaagt tccctttct attcttact gagaacatcc				6707
tgtaagtgc tacattacaa ttcaaacact aatgttacg ttttactact aatctgatat				6767
gccaccactg atcaacttca cacataatca acatcaaaga aaataacttg gcgacttaat				6827
ggtctttgtt tgtgcagcg caataacaag ctctcagtt gagtttaag attggaaccg				6887
gtaaactcta ttcttactg aattgtagaa cacatacta accacagaat aatctatgga				6947
tgaatcttg agcctccct acttctcat gccctctcaa accccaaac cgattcccaa				7007
gaacaatcaa tgccttttac cagtctgtcc aatgccgat ttctctaaa gatctatctg				7067
ttctgaattt gattgttagc aacagtacg tggctattat gttacagcca actattatgt				7127
ctacttatca ttgagataga cagcatttga aggttagacg aagatcgag aatcctttc				7187
tgaactgct caggatcaa gtctgcaca atgatgcaa ctgtataaa ctcaaatgaa				7247
aggctgatat acaatgaaca aattataacg aaagttaaga ctttagatac ctttcttgc				7307
ttagtatt gttaataagt agocatgaa catgcaatgc cctctgctat atcttctct				7367
ctaacaagga catatcttc ttcccttga gccatggtt catcatccca aagatcatct				7427
tcactaacta catcccaaga gctactatct tctaaaacac cagaatcac aatcatctat				7487
acaaccaatg agcaaacagg cttaaaaaaa acattatagt cctcaccagc aagatgttgc				7547
ggcctgaaa ctgggttga ctcaatcttt tcaaggaaat catcacatc aacctggat				7607
ttgatgagat catataactg aaacaaggaa gaagaaagtc atgacattat tgtatcatta				7667
caaacatatg acgcatcatt ataaaatgtt gatgtataga cattcaccaa aattcaacgc				7727
acatttattt gataaacaaa aagttccgaa ctttaaagct tgaagcaaat ttctctca				7787
attctcttc agagagatgc atatacttac ttcatcagct tcaggatctt ctgacatgga				7847
agaagaaact tctccctgc tctcttga cccacttccc tgcgggtgc ttttatcatc				7907
ttcatgtct tcagaactga ctctgctaa gttaataac tcagggtc tctgcaatc				7967
attgagcaaa gcttgcaag ttttccgtt gacacgaata ttatcttat cgattcgttt				8027
tcctttgcgc tcgtattgt tatccatgtt attgggtatt acccaatcct cagagaggat				8087
acaatcgaag ctcttgcgc atagaatcct ttgaagaaca agatctgaga agacgacgac				8147
tgaatcagc ttgttgcgc gcaattctc ttctttgtt ttgtttgtt ttgttttca				8207
cgttataaaa aaaaaatgga gttttttt attatgtgt agctgtacg tgaactaat				8267
tggtttttaa aacaagattt ttgacattg gttgtcttt ctctacgaa ttgctatgct				8327

attaaaaaa gcttcacaaa actattacta tagtataatc tttttggaca gagaccataa 8387
 ttgagaaagc agaagaata ataacacttg ttttcttgc ttatcgaata aattgggtcg 8447
 ggctttgaga tttttatctt ttigtctcgt gggttgggtt tgttgagaga catctacatg 8507
 ggtttggac tttggagct tgagtgat ttttggattt ttttttgaa ggaccaacta 8567
 tgattatatt cattaatatt ccccaatcaa ttgatcatt atggattaca cgtattaagt 8627
 catcttatt taattttgat catttagttt acttttagatt ttcatctga attaccattt 8687
 gattgaatc ttcttaccat tegtctcga ttcatlttga tatgaatagg ggttgaatc 8747
 ttattttaa cactcatcca acaattttcg ataacaagag catttatccg aacgactatc 8807
 ttgcatctc gacttatitg gaagagttat cattgatatt ttattccact cttttgcgt 8867
 ttttttcat tccagtagtt ttaattctct aggtttaatt atatatctga tgatagtact 8927
 agacttctgt ttcataaatt taccttctgt gactatgttc cccccgttg gataatcgg 8987
 aattaatcat ttttgggtct atctaatlg aaacatattt agtagatact tgatagatc 9047
 aaattaaaa atatacttat tattatttta tatgctgat gcaaaaaag gaaaggaaaa 9107
 tggacatcca aaaagaaaag gtgtcgaat tiagtccag ttctttctc ctttctgaa 9167
 gtttcaacc caaaccccca tgtaaaaaa gcgagaggc actgaaaaga caagtggga 9227
 ttgaatgtgt ttatatatat agatagtgt gttttgcag acattgcagt tgatagtct 9287
 tgaacttct gatatatga gagagaccag ggacatgaat ccaaacatca agacacattc 9347
 agacaaagcc aaacagtatc ccatcaatgc ttcacgacca cgtatatga tagttattgt 9407
 cttttttga ccaggtatct gtagattat tgcittttt tgaacttata aacacaaaaa 9467
 caaattcgcg ctctctcag gagtagcat acttgcactt tattaacatg tttatcttt 9527
 tggtaagtc tatgacattt ttttaataa tacatacgag taattggaa gaaaagcaat 9587
 tgtcaaaacc tgtgatatga cgaacgattc gtacattttt tacttttgt atttaactgt 9647

tatgggaaca aaaagtatat ggtcaatgcc gccaaaattg taagttgat ggttagtag 9707
 aggataaagt agcccgcttt ctgagaagc agtcaaatat gtgtgtgga agacaagaat 9767
 agccagcttt cttaaacgtt atagctaatt gctacgtatt aattatacca cacttgaag 9827
 atccaataaa gaagcataat tgtacaataa gattattaaa atgaaaaca tcattagaga 9887
 taatatttta aatttctcca gaatatgatt gaagacactt ggaagcatat ttatatagt 9947
 caaatcaaat taattccga acaagctaaa gaaaaccata aaccgaagt ttgagagaga 10007
 ttacacgtg gaaagatag tcaattctga tacaanaafa aaactaagt agataaaaa 10067
 gcaaacgatt ctctatgac aaaaacaaa aaaaaaac ctagtctctt gattcatct 10127
 aacacaaaac aaaaaaac aaaaaagaa agaagagat ttgtgaaaga aggttgggt 10187
 agtatggcg tggagctctg gctgtaggcg cccaaataac atcagagcca ccatgtgg 10247
 aactgtacat tgataccga cagactctc ctccacttcc cgcacttct cctgactctt 10307
 caccgccacc agagaccgc ggagattgtc cctctcttc cctgtccc gccgagtgt 10367
 tttgtcttc ttccgccgt aaccggtgat aagaagggt gtgaaactt gcggcgatga 10427
 cgtaaactgt tctgccgaa ataagtgac cagcgacgaa cctccgatg attgtctt 10487
 gaggtccagc gagagagcg gtgaagaagt tagaaacgg agagacaag gaagtacgag 10547
 gcggaggagg gagaacggt gcggagacg agaggagat aaactttcca tggaaagta 10607
 tggtagagcc aagagctgcc ggtgatgct gacgtaaagt gacgttagct acagagccag 10667
 agccactaag gacgcagact ccgatggatt tacggcgca gaaacgttg atgcttca 10727
 cgacgtctgt tctgaagga acttcagga tgaaggact cataggagg tccgtgtcac 10787
 gtgtgacgaa gacgggtgt ttagtittt ttttgaacc tgggtctg ccactggac 10847
 gtccgaccac ttcatggag gactcatga cgtgggggt tacgtggag gagaagtga 10907
 agtgagaggt aagagagtgt tttgttgtt gtgttctg ttgtttga tgaaggaa 10967
 gcttggaaaa catttcgtta ctctttgt ctctgtatc accttcatc ttgttttc 11027
 ttattttat gatttttta tttagattt cagatttgc ttggatttt tgtgtaagt 11087
 atttaaaaag aaataaaag aggaggaaga agagaagaa gatgtaggg ttgttgtat 11147
 ggggtgaata aagagatgat agaggagag gacttttct aatcccttt gggaaatgt 11207
 atggtgata aagtataaaa tggaaaagta ttgcttatt ttttttaatt attattaaaa 11267

gaaatggtt tgttttctat aaaaagaaaa aaagagaaat gagaggatag ggaagaagga 11327
 agatgagctt tgaaagcaag aaaagagagc ggcgccgcta gttgggaatt gcaagtgaag 11387

aaaacaaaat acgtgtcttt ttgttgagg ttacactct cttctttttt tttttaata 11447
 aagtttttgg gtccaacta tattataata tagtatttga tcaaaacttc gtctattaca 11507
 aaaatataat actttatgaa agttttttta gaatacagta tcaacgacat aaaatttaaa 11567
 tttttttttt tttttaaaagt gacttgctat atagtcattg gatatgtaga atttattcta 11627
 aaacctgatt tgattagtga tgcagagaga aaaaaaagat agggaggaga caagtgggga 11687
 atggatgatg agagaggag agggacatcc cccatttccc aaatctggag tgtctatga 11747
 atcaattcgg tctctttcac atctctcttg ttggcctcat tttcactctt ttaagtttta 11807
 tcttcttctc cttcatcatt attaacctat ccatgttact atttggttaa cactatacaa 11867
 ttcatctacc aactgtcctg caacgtattt cgttttcaat atcatttttt tctcttgga 11927
 actattttta aaaatttgaa tatcttccca cgaataacat atcatttctg gtaaggttg 11987
 ttgtaatgca tgcaggactg aatgtatgat acatataaat ttgaataaat ttgatatat 12047
 agttataaac ttaacgaat ctaatttggg gtttaggttt aaaataacat aaaattacgt 12107
 atgatttttt cttctttttt tggtaacaa acaaaattaa actaatatct atttcatgaa 12167
 tattcttttc tacatcacgt agtggatag taactaggat tccataatat atgtgatag 12227
 tccatgtttt atigaagatg tgcagagaat acaaaaaatg gtcacaaga gagaagaagt 12287
 tatgcacgta gccatgttct catgctagc ta 12319

<:210>: 4

<:211>: 28

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:220>:

<:223>: Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence

<:400>: 4

tcaaatagat atatgtaata tgtttgc

28

<:210>: 5

<:211>: 28

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:220>:

<:223>: Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence

<:400>: 5

caataaataa ttatacaaaa ctttcaag

28

<:210>: 6

<:211>: 25

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:220>:

<:223>: Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence

<:400>: 6

tacttaataa agtaggataa tgtcg

25

<:210>: 7

<:211>: 25

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:220>:

<:223>: Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<:400>: 7

gaacatgaat tcatgtgta cactg

25

<:210>: 8

<:211>: 28

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:220>:

<:223>: Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<:400>: 8

gcttataaat ggtataaac ctatcagc

28

<:210>: 9

<:211>: 28

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:220>:

<:223>: Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<:400>: 9

tgcttaattc tccgtaaca ttaccggc

28

【図面の簡単な説明】

【図1】 acw1変異体の根切片におけるウラニルアセート・クエン酸鉛染色の結果を示す電子顕微鏡写真である。Aは野生型、Bは21度（許容温度）での変異体、Cは31度（非許容温度）での変異体における結果をそれぞれ示す。

【図2】 acw1変異体の下胚軸におけるウラニルアセート・クエン酸鉛染色の結果を示す電子顕微鏡写真である。Aは野生型、Bは31度（非許容温度）での変異体における結果をそれぞれ示す。

【図3】 acw1変異体の根切片におけるPATA₂染色の結果を示す電子顕微鏡写真である。Aは野生型、Bは31度（非許容温度）での変異体における結果をそれぞれ示す。

【図4】 野生株とacw1変異体の細胞壁構成糖成分を分析した結果を示す。AはTFA可溶層の構成糖量を、BはTFA不溶画分（残さ：セルロース）の構成糖量を示す。Rha；ラムノース、Fuc；フコース、Ara；アラビノース、Xyl；キシロース、Gal；ガラクトース、Glc；グルコー

ス、Uronic acid；ウロン酸

【図5】 野生株とacw1変異体のセルロース繊維を観察した結果を示す電子顕微鏡写真である。上は野生株のセルロース繊維、下はacw1変異体のセルロース繊維を示す。矢印は、強酸処理により太くなった繊維を示す。

【図6】 野生型とacw1変異体のセルロースの重合度を解析するために行ったGPCのクロマトグラムの結果を示す。白丸は変異体、白三角は野生株の結果を示す。横軸は、カラムから溶出される時間を示し、縦軸は検出器で検出された値を示す。早い時間のピークほど分子量が大きい。

【図7】 野生型とacw1変異体のクロロフォルム/メタノール層を、TFA加水分解し、薄層クロマトグラフィー（TLC）を行った結果を示す。レーン1はグルコースの対照、レーン2はガラクトースの対照、レーン3は野生株、レーン4は変異体、の結果を示す。明瞭なグルコースのスポットが観察される。

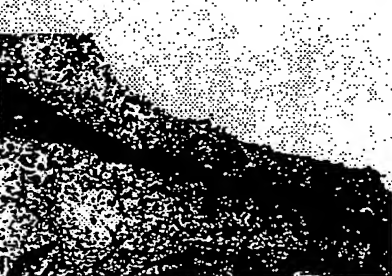
【図1】



【図2】



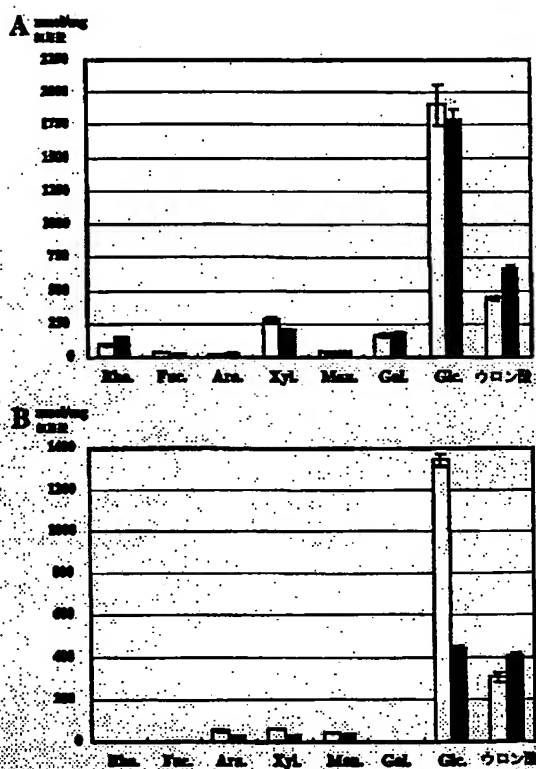
【図7】



【図3】



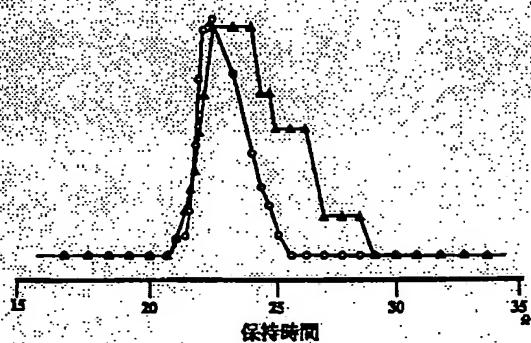
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
(C12N 9/42
C12R 1:91)

識別記号

F I

テームド(参考)

(72)発明者 佐藤 茂

茨城県つくば市千現2-1-6 つくば研
究支援センターD-21 株式会社三井物産
植物バイオ研究所内

(72)発明者 加藤 友彦

茨城県つくば市千現2-1-6 つくば研
究支援センターD-21 株式会社三井物産
植物バイオ研究所内

(72)発明者 田畑 哲之

千葉県木更津市矢野内野1532-3 かずさ
ディー・エヌ・エー研究所内

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The technical field to which invention belongs] This invention relates to the alteration using the gene which carries out the code of the cellulase Mr. protein which participates in vegetable cell wall composition of a vegetable cell wall component.

[0002]

[Description of the Prior Art] Changing a cell wall component in vegetation has important various meaning in the field of industry or agriculture. For example, the alteration of vegetable cell ***** brings about improvement in the digestion effectiveness of fiber raw-material vegetation, such as pulp by raising a cellulose hemicellulose content, and a useful agricultural products and a forage crop etc., and is significant in respect of economical efficiency or profitability. Moreover, it is also possible to bring about the creation of raw-material vegetation which has new industrial value by structural change of the polysaccharide which is a cell wall component.

[0003] As for composition of the polysaccharide component similar to a cell wall and it, bacteria, a fungus, and not only vegetation but the animal is performed. Research with the molecular level of cell wall composition is seldom done for analysis in spite of the industrial importance. About research with the molecular level of vegetable cell wall composition, analysis began to be performed in recent years using the technique of molecular genetics. As a gene which participates in cell wall composition, cellulose synthetic enzyme etc. is reported until now, for example (T.Arioli et al. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis. Science 279:717-720 (1998)). however, as a gene in connection with cell wall composition It is thought that many genes by which isolation is not yet carried out exist. It is related with cell wall composition. ** -- it is thought that a strange device exists (bibliography:) [Y.] Kawagoe and D.P. Delmer, Pathway and genes involved in cellulose biosynthesis; Genetic engineering 19 Plenum Press and New York and 1997; K. Nishitani, Construction and Restructuring of the cellulose-xyloglucan framework in the apoplast as mediated by the xyloglucan-related protein family-A hypothetical scheme. J. Plant Res. 111:159-166 and 1998.

[0004] On the other hand, the cellulase is known as an enzyme which disassembles a cell wall. The cellulase is reported by bacteria, a fungus, slime mold, vegetation, etc. until now as an enzyme (Endo beta-1, 4 glucanase) which decomposes beta-1 and the polysaccharide combined four times (Beguin, P. Annu. Rev. Microbiol. 44, 219-248. 1990). From the active site distinguished from the hydrophobic analysis of an amino acid sequence, being divided into 6 or the class beyond it is shown. Among those, a vegetable cellulase belongs to E family (Beguin, P. Annu. Rev. Microbiol. 44, 219-248. 1990). E family cellulases, such as bacteria, hold the typical cellulose joint domain, are secreted out of a cell, and can decompose crystalline cellulose. Bacteria etc. make the nutrient the glucose which is a degradation product.

[0005] It is said that the cellulase of a higher plant is related to the alteration of the own cell wall of a cell with growth, generating, differentiation, etc. (D.J. Cosgrove, How do plant cells extend.). Plant Physiol. 102, 1-6, 1993. therefore, to the cellulase of the vegetation which the cellulase needed to be secreted out of the cell and reported until now The transit peptide for secretion exists altogether (). [Z.] Shani, M. Dekel, and G. Tsabary and O. Shoseyov. Plant Mol. Biol. 34. 837-842, 1997. M.L. Tucker, R. Sexton, E. del Campillo and L.N. Lewis. Plant Physiol. 88:1257-1262. 1988.

[0006] Change of the structure of a cell wall, a property, etc. has arisen at the time of vegetation or differentiation. For example, composition of a new cell wall, qualification, reconstruction of the cell wall carbohydrates which already exist, etc. arise, and, thereby, the magnitude of a cell, the form, the function, etc. change. Until now a vegetable cellulase The hemicellulose or cellulose which has beta-1 and 4 glucan chain as backbone is made into a target. it is suggested that it functions (it Wong(s) Y. -S. --) G.B.Fincher and G. A.Maclachlan.J.Biol. Chem.252, 1402-1407.1977. T.Hayashi, Y.-S.Wong and G.A.Maclachlan.Plant Physiol.75, 605-610, 1984. However, since the point [contradictory] of not holding the cellulose joint domain required in order to decompose crystalline cellulose exists, in vegetation, it is not clarified what the cellulase is actually functioning in label, but the knowledge in a higher plant is very scarce compared with cellulases, such as bacteria.

[0007] this invention persons by the way, in the ensemble of the thale-cress processed by the chemistry mutation agent EMS # the configuration of a cell or an organ where the retrieval number 66 was given found out the unusual mutant (the Heisei 8 thale-cress [8 25 days / per month / 7th] workshop --) March 27, Heisei 9 The Japanese Society of Plant Physiologists annual convention in the 1997 fiscal year, November 13, Heisei 9 The 8th thale-cress workshop, May 3, Heisei 10 Japanese Society of Plant Physiologists annual convention in the 1998 fiscal year. This mutation was named acw1 (altered cell wall 1), and the gene leading to this mutation was named ACW1 gene. However, about ACW1 gene, isolation is not yet carried out.

[0008]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention makes it a technical problem to change a vegetable cell wall component using the gene which carries out the code of the enzyme which participates in vegetable cell wall composition.

[0009]

[Means for Solving the Problem] By using the technique of positional cloning, this invention persons identified a single gene leading to ACW1 variation which brings about abnormalities of vegetable cell wall composition in vast chromosome region, and succeeded in isolating. this invention persons determined a base sequence of ACW1 isolated gene, performed data base retrieval of a gene relevant to this and a structure target, and found out the same gene as ACW1 gene on a data base. This gene was characterized as a homologue of a secretor cellulase of vegetation known as a cell wall dialytic ferment until now.

[0010] However, as a result of this invention persons' performing various analyses per cell wall component of acw1 variant, it found out that protein ("ACW1 protein" is called hereafter) ACW1 gene carries out [protein] a code had a function in connection with composition in a surprising thing rather rather than disassembly of a cell wall. A report of a cellulase which participates in composition of a cell wall is not made until now. this invention persons found out that it was possible to change a vegetable cell wall component by using ACW1 gene from a property of such ACW1-protein.

[0011] This invention relates to an alteration using a gene which carries out the code of the cellulase Mr. protein which participates in vegetable cell wall composition of a vegetable cell wall component, and, more specifically, is (1). DNA, (a) array number which are used in order to change a vegetable cell-wall component and which are chosen from (a[following]) from (d): DNA which carries out the code of the protein set to 1 from an amino acid sequence of a publication.

(b) Array number : DNA which carries out the code of protein with which 1 or two or more amino acid have substitute, deletion and/, or an added amino acid sequence, and are set to array number:1 from an amino acid sequence of a publication in an amino acid sequence given in 1, and the protein equivalent on a functional target.

(c) Array number : DNA which contains a coding region of a base sequence of a publication in 2.

(d) Array number : DNA which is DNA set to 2 from a base sequence of a publication, and DNA to hybridize, and carries out the code of protein set to array number:1 from an amino acid sequence of a publication, and the protein equivalent on a functional target. (2) DNA given in (1) whose a vegetable cell wall component is a glucan chain, (3) It is characterized by using DNA chosen from

(d) from (a) in (1). How (4) to change a vegetable cell wall component A method given in (3) whose a vegetable cell wall component is a glucan chain (5) By installation and a manifestation of DNA which are chosen from (d), from (a) in (1) Transformation plant body with which a cell wall component is changed as compared with a plant body of a wild type (6) A vegetable cell wall component is related with a plant body given in (5) which is a glucan chain.

[0012]

[Embodiment of the Invention] This invention relates to use of DNA which carries out the code of the cellulase Mr. protein which participates in composition of the vegetable cell wall for changing a vegetable cell wall component. Specifically, the alteration of the cell wall component of the vegetation in this invention is performed by creating the transformation plant body holding DNA which carries out the code of the cellulase Mr. protein which participates in composition of a vegetable cell wall. As DNA used for the alteration of a cell wall component, the "ACW1" gene is desirable. The base sequence of cDNA of the "ACW1" gene in which isolation was done by this invention persons is shown in array number:2, and the base sequence of genomic DNA is shown in array number:3.

[0013] In the alteration of the cell wall component of the vegetation of this invention, as long as the code of the protein which has a function equivalent to "ACW1" protein is carried out, it is also possible to use DNA other than the "ACW1" gene. As such DNA, for example in the amino acid sequence (array number: 1) of "ACW1" protein, 1 or two or more amino acid have substitute, deletion and/, or the added amino acid sequence, and DNA which carries out the code of "ACW1" protein and the protein equivalent on a functional target is mentioned. In this invention, as for "being an EQC functionally", protein points out vegetable cell wall composition and more specifically functioning in composition of a glucan chain. It can be detected again as change of "ACW1" gene expression control or cell wall composition of the vegetation by functional inhibition of "ACW1" protein, for example, change of a cell wall component, (are recording of amorphous glucan), and change of an organ or a cell gestalt by the functional complementation trial by making the "ACW1" gene discover in a variant whether protein functions in vegetable cell wall composition. The artificial alteration of the amino acid sequence of "ACW1" protein can be carried out using "Transformer Site-directed Mutagenesis Kit" and "ExSite PCR-Based Site-directed Mutagenesis Kit" (product made from Clontech), if they are variation and substitute, and if it is deletion, it can be carried out using "Quantum leap Nested Deletion Kit" (product made from Clontech) etc. Usually the number of alterations of amino acid is less than 50 amino acid, is less than 30 amino acid preferably, is less than ten amino acid still more preferably, and is less than three amino acid still more preferably. Moreover, the variation of amino acid may be produced also such in not only an artificial thing but in a nature.

[0014] this invention persons have found out that the substitute (thereby replaced from the amino acid glycine of the 429th place to a serine) to the adenine of the base guanine of the 1355th place of ACW1 gene produces temperature sensitivity variation protein (an unusual expression system is given under a high temperature condition although the expression system of a wild type is given to vegetation under a low temperature service) in acw1 variation (example 1). In this invention, it is possible to also use the protein which shows a function equivalent to "ACW1" under a specific temperature in this way. Such protein is useful at the point which can control a function by temperature control.

[0015] Moreover, in this invention, as long as the code of the equivalent protein is carried out to "ACW1" protein and a functional target, it is also possible to use DNA of other vegetable kind origins which have the base sequence of the "ACW1" gene and the base sequence which shows homology. Such DNA for example All or a part of base sequences of the "ACW1" gene Hybridization technology used as the probe () [Southern 1975 J.Mol.Biol.98:503,] [Maniatis et al.MolecularCloning Cold Spring] harbor Laboratory Press -- moreover, the PCR technology () which made the primer the oligonucleotide specifically hybridized in the "ACW1" gene [Shimamoto ****] Takuji Sasaki Editorial supervision, "vegetable PCR experiment protocol" (cell technology separate volume, vegetable cell technology series 2) Shujunsha It can isolate on April 10, 1995 using issue. Saying "it is an EQC functionally", protein points out

vegetable cell wall composition and more specifically functioning in composition of a glucan chain like the above. DNA obtained by hybridization technology or PCR technology usually has the "ACW1" gene and high homology, when carrying out the code of the protein which has a function equivalent to "ACW1" protein. the level of the amino acid in which each DNA carries out a code to high homology – setting – 45% or more of homology – desirable – 60% or more of homology – further – desirable – 75% or more of homology – further – desirable – 90% or more of homology – 95% or more of homology is pointed out still more preferably. As vegetation other than the thale-cress for isolating such a gene, although a rice, corn, a potato, tobacco, cotton, an acacia, a pine, a Japan cedar, a eucalyptus, poplar, etc. are mentioned, it is not restricted to these, for example.

[0016] In order to make these DNA discover by vegetable intracellular one, a manifestation cassette including the terminator array containing a polyadenylation region required for stabilization of the DNA molecule connected with the lower stream of a river of the promotor array which can be imprinted by the (i) plant cell, and the transcript connected with the lower stream of a river of this gene if needed [(ii)] is introduced into a plant cell.

[0017] A manifestation cassette may contain the promotor for making DNA inserted discover constantly or inductively. As a promotor for making it constantly discovered, 35S promotor (Odell et al.1985 Nature 313:810) of a cauliflower mosaic virus, the actin promotor (Zhang et al.1991 PlantCell 3:1155) of a rice, the ubiquitin promotor (Cornejo et al.1993 Plant Mol.Biol.23:567) of corn, etc. are mentioned, for example. Moreover, the promotor by whom it is known as a promotor for making it inductively discovered that it will be discovered with external causes, such as infection of mold and a bacterial virus, invasion, low temperature, an elevated temperature, desiccation, an exposure of ultraviolet rays, and spraying of a specific compound, for example is mentioned. As such a promotor, for example By infection and invasion of mold and a bacterial virus Discovered promotor (Xu et al.1996 Plant Mol.Biol.30:387) of a rice chitinase gene and promotor of PR protein gene of tobacco (Ohshima et al.1990 Plant Cell 2:95), The promotor of the "lip19" gene of the rice guided by low temperature (Aguan et al.1993 Mol.Gen Genet.240:1), The promotor of the "hsp80" gene of a rice, and the "hsp72" gene guided according to an elevated temperature (Van Breusegem et al.1994 Planta 193:57), The promotor of the "rab16" gene of the thale-cress guided by desiccation (Nundy et al.1990 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1406), The promotor of the chalcone synthetic enzyme gene of the parsley guided by the exposure of ultraviolet rays (Schulze-Lefert et al.1989 EMBO J.8:651), The promotor (Walker et al.1987 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:6624) of the alcohol dehydrogenase gene of the corn guided by the anaerobic condition etc. is mentioned. Moreover, "rab16" is guided by spraying of the abscisic acid of plant hormone with the compound of specification [the promotor of a rice chitinase gene, and the promotor of PR protein gene of tobacco], such as a salicylic acid.

[0018] There is especially no limit as a plant cell into which a manifestation cassette is introduced. The cell of the plant body which desires to change a cell wall component can be used. For example, cells, such as thale-cress, a rice, corn, a potato, tobacco, cotton, an acacia, a pine, a Japan cedar, a eucalyptus, and poplar, are mentioned. As a plant cell into which a manifestation cassette is introduced, the cell in a plant body besides a cultured cell is also contained. Moreover, a protoplast, a shoot germ, many blastemas, and a capillary root are also contained. Installation of the vector to a plant cell For example, the introductory method using *Agrobacterium* (Hood et al.1993 Transgenic Res.2:218, Hiei et al.1994 Plant J.6:271), The electroporation method (Tada et al.1990 Theor.Appl.Genet 80:475), The polyethylene-glycol method (Lazzeriet al.1991 Theor.Appl.Genet 81:437), It is possible to use well-known various methods for these contractors, such as the party Kurgan method (Sanford et al.1987 J.Part.Sci.tech.5:27).

[0019] The plant cell by which the transformation was carried out can create a plant body by making it reproduce. Although the reproductive method changes with classes of plant cell For example, if it is a rice, Fujimura's and others (Plant Tissue Culture Lett.2:74 (1995)) method will be mentioned. If it is corn, Shillito's and others (Bio/Technology 7:581 (1989)) method and Gorden-Kamm (Plant Cell 2:603 (1990)) and others will be mentioned. If it is a potato, Visser's and others (Theor.Appl.Genet 78:594 (1989)) method will be mentioned. If it is tobacco, the

method of Nagata and Takebe (Planta 99:12 (1971)) will be mentioned, and if it is thale-cress, Akama's and others (Plant Cell Reports 12:7-11 (1992)) method will be mentioned. As compared with the plant body of a wild type, the manifestation of the protein of this invention changes and, thereby, as for the plant body which could be obtained from the plant body created by this or its propagation data medium (for example, a seed, a tuber, ****, etc.), a cell wall component is changed. As "an alteration of a cell wall component", the quantitative alteration of a cell wall component, a qualitative shift, and change of a cell gestalt are included. As a cell wall component, it is a glucan chain preferably. The alteration of a glucan chain includes adjustment (there are for example, a conifer mold, a broad-leaved tree mold, the Dicotyledon mold, and a single cotyledon mold in the polymerization degree of glucan) of the polymerization degree (the number of the sugar which is carrying out the polymerization) of glucan, and adjustment of degree of crystallinity (glucan is the size of the fiber bundled and formed and is the determinant of fiber reinforcement).

[0020] The alteration of the cell wall component in vegetation has many advantages. The increment in a cell wall component can bring about the increment in fiber Hara, such as an increment in a vegetable amount of growth, and pulp, and the qualitative shift of a cell wall component can bring about development of new materials and the increment in the digestion effectiveness of a forage crop. Moreover, applying change of a cell gestalt to the creation of the vegetation for appreciation which has new aesthetic value is also considered.

[0021]

[Example] Although an example explains this invention further below at details, this invention is not restricted to these examples. In addition, the method required for general gene recombination, such as cutting of DNA, connection, a transformation of *Escherichia coli*, base sequence determination of a gene, and hybridization, followed in the description attached to the reagent of marketing used for each actuation, the machinery, etc., and an experiment document (for example, "Molecular cloning" (Maniatis T. et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press)) fundamentally. Moreover, training using the agar medium and soil of thale-cress, mating, and preparation of genomic DNA followed in an experiment document (for example, "experiment protocol of model vegetation (Shujunsha)") fundamentally.

[0022] [Example 1] In order to determine the location on isolation **** of ACW1 gene, and the chromosome of ACW1 gene, it mapped by using a molecule marker. Since acw1 (altered cell wall 1) variant was found out in the colon BIAE cotype of thale-cress, it crosses the run ZUBAGU EREKUTA kind which is another EKOTAIPU to this variant, gathers the seeds of a next-generation seed to it, made it grow it, carried out inbreeding, and obtained the F2 generation seed. This F2 generation seed was budded and genomic DNA was extracted from the raised vegetation (830 individuals). The recombination value was computed for "2I5 which produced these genomic DNA themselves as a marker, 2.2", "miP 5-9, and 1.1" by the PCR method to this genomic DNA using each. Specifically compounded "2I5, two kinds of PCR primers "array number:4/5-TCAAATAGATATATGTAATATGTTTCGC-3" which can amplify 2.2", and "array number:5/5-CAATAAATAATTATACAAAACCTTCAAG-3", F2 generation genomic DNA was made to amplify using the PCR method using these, and it investigated by agarose electrophoresis. With this molecule marker, in order to show a band in 110bp(s), when it calculated based on this to them, as for the run ZUBAGU kind, between ACW1 gene and this marker, recombination was accepted in 112bp(s) by them in one chromosome, as for the Colombia kind. Next, compounded "miP 5-9, two kinds of PCR primers "array number:6/5-TACTTAATAAAGTAGGATAATGTCG-3" which can amplify 1.1", and "array number:7/5-GAACATGAATTCATGTGTTACACTG-3", F2 generation genomic DNA was made to amplify using the PCR method using these, and it investigated by agarose electrophoresis. With this molecule marker, since it was known that a band is shown, when it calculated based on this to 91bp(s), as for the run ZUBAGU kind, between ACW1 gene and this marker, recombination was accepted in 87bp(s) by them in one chromosome, as for the Colombia kind.

[0023] Facing across the field on the chromosome which contains ACW1 gene as mentioned above with two molecule markers of "2I5, 2.2", "miP 5-9, and 1.1" was checked. Then, it decided to isolate the genome DNA fragment which contains each for molecule marker "2I5, 2.2", "miP 5-

9, and 1.1", and to advance gene isolation. The genomic DNA library (about 10000 clones) which consists of genomic DNA of the thale-cress *Colombia* kind of 60-90kbp specifically "2I5, 2.2", "miP 5-9 and 1.1" are screened as a probe. With "2I5 and a 2.2" probe three clones (it was named TAC6M17, 12J22, and 13F4) Two clones (it was named TAC 15E4 and 9P8) were obtained with "miP 5-9 and a 1.1" probe. The DNA fragment (about 600b) by the side of "left" of "TAC 15E4" ("2I 5, 2.2" side) (this fragment is called "15E4-L") was isolated using the TAIL-PCR method (vegetable PCR experiment protocol (Shujunsha)). Under the present circumstances, L1, L2, L3, and AD2 were used for the TAIL-PCR method as a primer. Two kinds of PCR primer "array numbers which can amplify "15E4-L" based on the base sequence of the isolated DNA fragment : 8/5-GCTTATAAATGGGTATAAACCTATCAGC-3", "array number : 9/5-TGCTTAATTCTCCGGTAACATTACCGGC-3" is compounded. The genomic DNA of a run ZUBAGU kind and the *Colombia* kind is made to amplify using the PCR method using these. When the base sequence was decoded, by the run ZUBAGU species, from the primer (array number: 8), it was admitted that the base sequence of the 96th place was T by the *Colombia* species at G, and it became clear that this DNA fragment could be used as a molecule marker. Then, when the distance of ACW1 gene and this new marker was computed with the F2 above-mentioned vegetation, recombination was not seen between 1660 chromosomes.

[0024] Since the TAC genomic DNA library was produced by the vector (TAC vector) which can carry out transgenics of the inserted DNA fragment to vegetation through *Agrobacterium* directly, it carried out transgenics of TAC6M17 and 12J22 to *acw1* variant using the hypocotyl callus transformation method. "Hypocotyl callus transformation Kazuhito Akama, Hideaki Shiraishi, Shozo Ohta, Kenzo Nakamura, and Kiyotaka Okada and Yoshiro Shimura; Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: comparison of the efficiencies with various According to the method of of organs, plant ecotypes and *Agrobacterium* strains", and "Plant Cell Reports 12:7 (1992)-11", 90 shares of MPs were used as AGURO bacteria. As a result, phenotype was recovered to the wild type by two individual. That is, an ACW gene will be contained to the field to which the genome DNA fragment contained in these "TAC6M17" and "12J22" clone overlaps.

[0025] Then, the base sequence of the DNA fragment of this field was decoded. It was expected between "2I5, and a 1.1" marker and the above-mentioned DNA field that four genes exist. Then, when the base sequence of the wild type of these four virtual genes was compared about *acw1* variant, it became clear that mutation had arisen in the gene field equivalent to cDNA (registration number U37702) registered as a cellulase homologue. In these four genes, since the variation of a base sequence was accepted only for the cellulase homologue in *acw1* variant, it became clear that this gene was ACW1 gene.

[0026] The five introns were contained when the overall length cDNA of ACW1 gene was isolated from lambdaZAPIIcDNA library (STRATAGENE). Homology was looked at by the cellulase when the amino acid sequence by which a code is carried out from a gene was analyzed. Generally, although a vegetable cellulase has the features, such as having a signal sequence without the cellulose joint domain which the cellulase of a fungus has for being secreted out of a film, it is not shown clearly what is made in label by in vivo one. It is thought that the product of ACW1 gene is also working as a cellulase. however, a new family which is different from other cellulases from the features, such as having ** film penetration domain where ** molecular weight does not have large (ACW1 is 69kD(s) and other most are about 54 kD degrees) ** signal sequence, and where a charge amino acid field exists in ** amino terminal side, -- a group -- then, it thinks.

[0027] [Example 2] Sterile seeding was carried out to histochemistry-analysis 1 / 2B5 culture medium of *acw1* variant, the root on the 7th and the bottom hypocotyl were cut off, and these samples were fixed at 4 degrees C in 3% glutaraldehyde liquid. The sample was washed by the phosphoric-acid buffer (pH7.0) (2-4 degrees C). In addition, the buffer was replaced 4 to 6 times at intervals of 10 - 20 minutes. Subsequently, it fixed with OsO4.3% KMnO4 liquid 1% for 1 to 2 hours, and washed by the account phosphoric-acid buffer of Gokami. It dehydrated by dipping a sample in alcoholic series (30, 50, 70, 90, 99.5, 99.5, 99.5% ethanol) for each 10 - 20 minutes. The sample was dipped in propylene oxide 4 times at intervals of 20 minutes, subsequently to an epoxy resin (Quetol 812) was dipped for 3 to 6 hours, and was made to permeate. The sample was paid to

the mold for embedding and the resin for embedding which added the epoxy resin (Quetol 812), the curing agent (DDSA), and the accelerating agent (DMP-30) was poured out. Subsequently to in 60-degree C humidistat, subsequently, it put into 45-degree C humidistat into 35-degree C humidistat on the 1st on the 1st on the 1st. It put for several days to one week into [after checking sufficient hardening] 45-degree C humidistat. The 0.1-micrometer ultrathin section sample was produced for the sample with ejection and the microtome for electron microscopes from the mold. After dyeing this ultrathin section sample by uranyl acetate citric-acid lead dyeing or PATAg, it was observed with the transmission electron microscope (the former has the operation which dyes sugar with the amorphous latter for amorphous polysaccharides, such as a hemicellulose and pectin).

[0028] the result of the histochemistry-analysis by this electron microscope -- the excavation of acw1 variant -- are recording of amorphous glucan accepts in uranyl acetate citric-acid lead dyeing in a piece -- having had (drawing 1 B and C) -- it did not accept in a wild type (drawing 1 A). The same result was obtained also in the bottom hypocotyl intercept (drawing 2). Moreover, in PATAg dyeing in a root intercept, are recording of amorphous glucan was similarly accepted only in acw1 variant (drawing 3). The glucan of these amorphous nature is transferred to a glucan chain longer than original, and is crystallized. Since amorphous glucan was being accumulated, it was thought that an ACW1 cellulase gene was a new cellulase with glucan transition activity. Although it was the cellulase of the higher plant only the function of decomposition activity has been expected to be conventionally, it was proved that ACW1 gene product has a function in connection with composition rather than disassembly of a cell wall. Such a cellulase sets ACW1 gene and there is no other example of a report.

[0029] [Example 3] After making it grow for two weeks at 21 degrees C of analysis of an acw1 cell-wall component, the cell wall component of a terrestrial part of acw1 variant grown for two weeks at 31 degrees C was investigated. Preparation of the cell wall rough purification sample for cell wall component analysis followed Zablackis's and others method (Zablackis et al, Plant Physiol, 107, 1129-1138 (1995)). First, the vegetation frozen in liquid nitrogen was mashed with the mortar, the phosphoric-acid buffer (pH7.0) was added, and this was moved to the centrifugal tube with the pipet. After crushing by the poly TRON (130rpm, 45 seconds, and 3 times), it carried out centrifugal (9,500rpm, 10 minutes, and four degrees C). Supernatant liquid was thrown away, the phosphoric-acid buffer was added, and it performed above crushing and centrifugal one again. This was repeated once again (a total of 3 times). In order to wash precipitate, it added and carried out centrifugal [of distilled water] (9,500rpm, 10 minutes, and four degrees C). This was performed a total of 4 times. Ethanol was added 70%, and it suspended well, and placed overnight (4 degrees C). Centrifugal was carried out, and after recovery, chloroform / methanol (1:1) liquid was added and it agitated with the stirrer (30 minutes). Centrifugal (9,500rpm, 15-minute, and four degrees C) backward supernatant liquid was thrown away, and chloroform / methanol (1:1) extract was performed once again. These chloroform / methanol (1:1) extracts carried out concentration hardening by drying by the concentration evaporator (this was used for the thin-layer chromatography of an example 5 etc.). A phenol / acetic acid / water (2:1:1) was added to the precipitate after centrifugal recovery, and with the stirrer, at the room temperature, it agitated for 1 hour and carried out centrifugal (9,500rpm, 15min.4 degree C). After repeating this once again, ethanol was added 100%, and it washed and carried out centrifugal. After distilled water furthermore washed twice, amylase processing (0.1M phosphoric-acid buffer + alpha-amylase five drops of 2mg/ml (Sigma) Aspergillus oryzae origin + toluene) was performed for 48 hours, shaking gently. Supernatant liquid was thrown away after centrifugal and distilled water washed 5 times. Precipitate finally collected was made into the cell wall rough purification sample. This was saved at -80 degrees C, the complement was thawed, and it used for analysis.

[0030] The sugar quantum was performed using this sample. First, the prepared cell wall sample was made to ***** with a suitable amount. 5mg was measured to the glass tube, 2.5ml (TFA) (0.5ml TFA / 1mg cell wall) of trifluoroacetic acid of 2M was added, it incubated at 121 degrees C all over the oil bath for 1 hour, and amorphous sugar was hydrolyzed. After cooling naturally to a room temperature, centrifugal (5, 00rpm, 10 minutes, and desk centrifuge) was

carried out, and it divided into supernatant liquid and **** (precipitate). Centrifugal [of distilled water] was added and carried out to ****, supernatant liquid was taken, and it added to the supernatant liquid extracted previously. After supernatant liquid hardened by drying, it was melted to 1ml of distilled water, and performed the sugar quantum. 72% H_2SO_4 was added to ****, and it put at the room temperature for 2 hours. It agitated gently on the way and melted. It diluted with distilled water 35 times, and in the boiling water, it boiled for 2 hours and hydrolyzed completely. It placed after voile and into ice, and cooled, the scalpel rise was carried out by the measuring cylinder, and the sugar quantum was performed. A sugar quantum is a phenol sulfuric-acid method about toral sugar, and performed the amount of uronic acid by the m-hydroxy biphenyl method. [0031] The result is shown in [drawing 4](#) . In the TFA soluble fraction, the amount (1790. 0**86.4 nmol/mg cell wall) of the glucose of acw1 variant was almost the same as wt (wild type) (1907. 6**158.4 nmol/mg cell wall). However, at a TFA insoluble fraction, there were few amounts (436.7**20.0 nmol/mg cell wall) of the glucose of acw1 variant than wt (1342. 5**31.5 nmol/mg cell wall). A thing insoluble to TFA is crystalline cellulose. Therefore, the glucose of a TFA insoluble fraction is the cellulose origin. It was shown by acw1 variant from this result that the cellulose is decreasing. There were more rhamnoses of acw1 variant and amounts (they are 145.7**7.0 and 659.6**31.7 nmol/mg, respectively cell wall) of uronic acid than wt (90.3**7.5 and 441.6**9.7 nmol/mg cell wall l). Since there were much rhamnose and uronic acid, it was suggested that pectin (Rhamnogalacturonan) is increasing. As for change of the dye affinity seen by electron microscope observation, the increment in pectin is considered to be the cause. As for the amorphous polysaccharide decomposed by TFA, the increment in pectin was suggested, and also there was especially no change.

[0032] [Example 4] The result of observation by the electron microscope of cellulose fiber of the cell wall of the observation wt and acw1 of cellulose fiber is shown in [drawing 5](#) . The residue after hydrolyzing the cell wall sample prepared in the example 3 by 2M TFA was observed with the electron microscope. Since amorphous polysaccharides, such as pectin and a hemicellulose, are decomposed by 2MTFA processing, most residues are crystalline cellulose. The fiber width of face of wt was about 3.0nm. That of acw1 is about 2.4nm, and was thin rather than wt. When strong acid processing is carried out, microfibril may swell, or cellulose fiber becomes a bunch, becomes very thick, and may be observed ([drawing 5](#) , arrow head). It is thought that many things which are bunches by wt (17nm) were observed because [of strong acid processing]. However, what is a bunch was seldom observed in acw1 which carried out same processing. Moreover, the size was also about 12nm. Although it could not say that the condition native in microfibril was observed for strong acid processing, the difference had arisen in the condition of the microfibril after processing. This is considered to reflect the difference in the property of the original microfibril of wt and acw1.

[0033] a cellulose -- straight chain-like beta- 1 and 4 Glucan is crystallized [it is bundled and] and made. Therefore, polymerization degree is known if the molecular weight is investigated. Then, next, in order to analyze the polymerization degree of a cellulose, the molecular weight was measured by gel filtration analysis. The cellulose sample used for measurement was prepared by Edashige's and others method (Edashige et al, Holzforshung, 49, 197-202 (1995)). It is a suitable quantity of a cell wall rough purification sample 0.05M CDTA, 0.05M Na_2CO_3 , 1N KOH, 4N KOH, and 4M KOH+3% Each liquid of a borate extracted sequentially. **** (crystalline cellulose) was nitrated with the fuming-nitric-acid + phosphorus oxide (V) liquid prepared beforehand. Suction filtration was carried out, reactants (nitrocellulose) were collected, and it washed in iced water. Suction filtration was carried out again, samples were collected, a little water was added, and it boiled lightly. It was made to dry at 60 degrees C after suction filtration furthermore. For gel filtration analysis, the sample was melted to the tetrahydrofuran and 50microl injection of was done by the syringe. Shimadzu LC-6A was used for the column.

[0034] Consequently, by wt, as for the polymerization degree (D. P.: degrees of polymerization) of microfibril, distribution was found in the large range of 5,000 from hundreds ([drawing 6](#)), and the average was about 1,000. However, distribution is very narrow, acw1 was seen at about 1 peak, and the average was about 5,000.

[0035] It was shown that ACW1 gene is a gene indispensable to cellulose synthase, and an amount, the quality (fiber width of face, polymerization-degree etc.), etc. of a cellulose change with the variation of this gene from the above fact.

[0036] [Example 5] After processing the analysis chloroform / methanol fraction of chloroform / methanol extract layer by 2M TFA, it was analyzed with thin-layer chromatography (TLC) (drawing 7). In thin-layer chromatography, first, 2M TFA was incubated at 121 degree C of suitable ***** for 1 hour to the chloroform / methanol extract layer which was prepared in the example 3 and which made it harden by drying, and this was hydrolyzed to it. Distilled water and chloroform could be added and it agitated, and centrifugal was carried out, and processing liquid is made to harden by drying and it hardened [supernatant liquid (water layer) was taken and] by drying. Again, spreading of the suitable ***** part was carried out to the silica plate for thin-layer chromatography by the syringe, and distilled water was developed with the solvent (n-butanol / pyridine / distilled water = 8:5:4). The plate was dried after expansion, the spray of the sulfuric acid was carried out, and it incubated with the hot plate. When the spot of sugar appeared black (development), it took down and cooled naturally from the hot plate.

[0037] The spot of a galactose was observed for wt and acw1 as a result of this analysis (drawing 7 lanes 3 and 4). This is considered to be the thing of the galactose-lipid origin which constitutes chloroplast membrane. In acw1, the spot of a glucose was also observed clearly (drawing 7 rain 4 arrow head). In wt, it was unobservable.

[0038] Moreover, in order to analyze the component of an extract, gas-chromatography analysis by the ARUDI toll acetate process was performed. A part of chloroform / methanol extract of an example 3 were made to harden by drying, and it melted in 250micro of sodium-borohydride (inside of 10mg [// ml] and NH₄OH) liquid l, and incubated at the room temperature for 1 hour. 250microl After adding 2 or 3 drops of acetic acids, the acetic acid/methanol (1:9) was added. It was made to harden by drying with slight warmth with a water bath (40 degrees C). This was performed a total of 4 times. The methanol was 250microl Added and was made to harden by drying similarly furthermore. This was also performed a total of 4 times. 50micro of acetic anhydrides l and pyridine 50microl were added to the sample which hardened by drying, and all over the oil bath, at 121 degrees C, it incubated for 20 minutes and acetylated. Processing which adds toluene 200microl and is made to harden by drying was performed twice after cooling. And it was easy to add dichloromethane 500microl and 500micro of distilled water l, it agitated and carried out centrifugal, the lower layer (dichloromethane layer) was taken, and it was made to harden by drying. It melted to a suitable quantity of the acetone, and applied to the gas chromatography (Shimadzu GC14A SP233 column).

[0039] A TFA meltable layer should just process the sample which hardened by drying by the above-mentioned method. The TFA **** (sulfuric-acid hydrolysis) sample used for processing what was condensed, after neutralizing by Ba (OH)₂.

[0040] Most of the sugar in an extract were a galactose and a glucose as a result of gas-chromatography analysis. wt is a galactose as a result of investigating a galactose and a glucose mole ratio. 88.9 mols (%), (%), glucose 11.1mol, and acw1 are a galactose. 70.0 mols (%), It was glucose 30.0mol (%). The amount of glucoses of acw1 had increased about 3 times in the mole ratio compared with wt.

[0041] It is expected that the glucose which is increasing by chloroform / methanol fraction is glucan. Then, molecular weight distribution were performed in gel-permeation-chromatography (GPC) analysis. wt and acw1 — after saponifying each chloroform / methanol fraction by NaOH, it was analyzed.

[0042] Consequently, the peak at which both are equivalent to 1, 3, 4, and 6 sugar was acquired. The area ratios of each peak of wt were 14.8%, 28.4%, and 20.7% 36.1%. The area ratios of each peak of acw1 were 15.2%, 30.0%, and 27.9% 26.9%. In acw1, the amount of 3, 4, and 6 sugar was increasing compared with wt. The increment in 6 sugar was 7.2% most mostly. Subsequently, it was 1.6% with 4 sugar. It was expected that the glucose which is increasing exists as an oligosaccharide of 4 and 6 sugar.

[0043] Then, the joint format of the oligosaccharide of the glucose expected next was investigated

with the methylation analysis method. They are a suitable amount, **, and DMSO about a cell wall rough purification sample. 0.5ml was added. It agitated at the room temperature for 2 hours, and 4 M Na-DMSO was added and it agitated for further 2 hours. reaction mixture -- the powder of a triphenylmethane color -- little ***** -- it checked becoming red, 50micro [of methyl iodides] 1 was added among ice, and it agitated for 1 hour. Then, 0.5ml of distilled water was added and nitrogen gas was blown. Reaction mixture was applied to Sep-Pak C-18 column, 100%, and purification liquid was made to harden by drying at a room temperature. [acetonitrile 2ml and 100% ethanol 4ml] 2M TFA was 250microl Added, hydrolyzed at 121 degrees C for 1 hour, reaction mixture was made to harden by drying, isopropanol 300microl was added, and it hardened by drying again. After adding 95% ethanol 220microl and NaBD4(inside of NH4OH) 200microl to the pan and making it react at a room temperature for 1 hour, 2 or 3 drops of acetic acids are dropped to reaction mixture, and the acetic-acid methanol was 250microl Added and it was made to harden by drying. This processing was repeated further 4 times. The processing which adds methanol 250microl and is made to harden by drying was repeated 3 times. Next, the acetic anhydride was 50microl Added, the reaction (acetylation) was carried out at 121 degrees C for 3 hours, and 500micro of distilled water 1 was added after cooling to a room temperature, and in addition, it 500microl Was still easier to add dichloromethane, and mixed until air bubbles stopped having come out of Na2CO3. Centrifugal is carried out at a low speed, and the dichloromethane layer was taken and it was made to harden by drying. It melted to a suitable quantity of the acetone, and a gas chromatography/mass analysis (GC-MS) was performed. Shimadzu QP-2000A and JEOL.JMS-DX303 were used for a gas chromatography/mass analysis.

[0044] Consequently, as for the galactose, terminal association, 2-association, 3-association, 4-association, and 6-association were detected. On the other hand, as for the glucose, only terminal association and 4-association were detected. the extract which carried out alkali saponification -- beta- 1 and 4 If it processes by the glucanase, a glucose monosaccharide will come out (data is not shown). By acw1 variant, it became clear from the above result that chloroform / methanol fraction has more beta-1 and oligosaccharides combined four times than wt (about 3 times), and the glucose is being accumulated.

[0045] Thereby, it was shown clearly for the first time that what the glucose combined [the lipid etc.] with beta-1 and the oligosaccharide combined four times further served as a substrate of cellulose synthase.

[0046]

[Effect of the Invention] Use of DNA which carries out the code of the cellulase Mr. protein for changing a vegetable cell wall component by this invention was offered. Since the alteration of a vegetable cell wall can bring about the creation of the vegetation for appreciation which has the new aesthetic value by change of the cell gestalt accompanying the increment in the supply effectiveness of fiber raw-material vegetation, such as pulp, development of the new materials by cell-wall composition control, the increment in the useful component of agricultural products, the increment in the digestion effectiveness of a forage crop, the increment in the amount of growth of the vegetation by cell-wall composite-quantity increase, and the alteration of a cell-wall component, it is useful in the field of agriculture

[0047]

[Layout Table]

SEQUENCE-LISTING<110> Oji Paper Co.,Ltd. Kazusa-DNA-Research Institute<120> Method of modifying plant cell-wall-components<130> M2-005DP2<140><141><150> JP 10-166174<151> 1998-5-29<160> 9 <170> PatentIn Ver. 2.0<210> [1] <211> 621<212> PRT <213> Arabidopsis thaliana <400> 1 Met Tyr Gly Arg Asp Pro Trp Gly Gly Pro Leu Glu Ile Asn Thr Ala 1 5 10 15 Asp Ser Ala Thr Asp Asp Asp Arg Ser Arg Asn Leu Asn Asp Leu Asp 20 25 30 Arg Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Asp Glu Thr Gln Gln Ser Trp Leu 35 40 45 Leu Gly Pro Thr Glu Gln Lys Lys Lys Lys Tyr Val Asp Leu Gly Cys 50 55 60 Ile IleVal Ser Arg Lys Ile Phe Val Trp Thr Val Gly Thr Leu Val 65 70 75 80 Ala Ala Ala LeuLeu Ala Gly Phe Ile Thr Leu Ile Val Lys Thr Val 85 90 95 Pro Arg His HisPro Lys Thr ProPro Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Ala 100 105 110 Leu HisLys Ala Leu LysPhe Phe Asn Ala Gln Lys Ser Gly Lys Leu 115 120 125 Pro Lys His

Asn Asn Val SerTrp Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gln Asp 130 135 140 Gly Lys Gly Glu Thr Gly Ser
 Phe Tyr Lys Asp Leu Val Gly Gly Tyr 145 150 155 160 Tyr Asp Ala Gly Asp Ala Ile Lys Phe Asn
 Phe Pro Met Ala Tyr Ala 165 170 175 Met Thr Met Leu Ser Trp Ser Val Ile Glu Tyr Ser Ala Lys
 Tyr Glu 180 185 190 Ala Ala Gly Glu Leu Thr His Val Lys Glu Leu Ile Lys Trp Gly Thr 195 200
 205 Asp Tyr Phe Leu Lys Thr Phe Asn Ser Thr Ala Asp Ser Ile Asp Asp 210 215 220 Leu-Val-
 Ser-Gln-Val Gly Ser Gly Asn Thr-Asp-Asp-Gly-Asn-Thr Asp 225 230 235 240Pro Asn Asp His
 Tyr Cys Trp Met Arg Pro Glu Asp Met Asp-Tyr-Lys 245 250255 Arg Pro Val Thr Thr Cys Asn
 Gly Gly Cys Ser Asp Leu Ala Ala Glu 260 265 270 Met Ala Ala Ala Leu Ala Ser Ala Ser Ile Val
 Phe Lys Asp Asn Lys 275 280 285 Glu Tyr Ser Lys Lys Leu Val His Gly Ala Lys Val Val Tyr Gln
 Phe 290 295 300 Gly Arg Thr Arg Arg Gly Arg Tyr Ser Ala Gly Thr Ala Glu Ser Ser 305 310 315
 320 Lys Phe Tyr Asn Ser Ser Met Tyr TrpAsp Glu PheIle Trp Gly Gly 325 330 335 Ala TrpMet
 Tyr TyrAla Thr Gly Asn Val Thr Tyr Leu Asn Leu Ile 340 345 350 Thr Gln Pro ThrMet AlaLys
 His Ala Gly Ala Phe Trp Gly Gly Pro 355 360 365 Tyr Tyr Gly Val Phe Ser TrpAsp Asn Lys Leu
 Ala Gly Ala Gln Leu 370 375 380 LeuLeu Ser ArgLeuArg Leu Phe Leu Ser Pro Gly Tyr Pro Tyr
 Glu 385 390 395 400 Glu Ile Leu ArgThr Phe His AsnGln Thr Ser Ile Val Met Cys Ser 405 410
 415 Tyr Leu Pro Ile Phe Asn Lys Phe Asn Arg Thr Asn Gly Gly Leu Ile 420 425 430 Glu Leu Asn
 His GlyAlaPro GlnPro Leu Gln Tyr Ser Val Asn Ala 435 440445 AlaPheLeu Ala Thr Leu Tyr Ser
 Asp Tyr Leu Asp Ala Ala Asp Thr 450 455 460 ProGly Trp Tyr Cys Gly Pro Asn Phe Tyr Ser Thr
 Ser Val Leu Arg 465 470 475 480 Asp Phe Ala Arg Ser GlnIle Asp Tyr Ile Leu Gly Lys Asn Pro
 Arg 485 490 495 Lys Met Ser Tyr Val Val Gly Phe GlyThr Lys Tyr Pro Arg His Val 500 505 510
 His His Arg Gly Ala Ser Ile Pro Lys Asn Lys Val Lys Tyr Asn Cys 515 520 525 Lys-Gly-Gly-Trp-
 Lys Trp Arg Asp Ser Lys-Lys-Pro-Asn-Pro-Asn-Thr 530 535 540 Ile-Glu-Gly-Ala-Met Val Ala
 Gly Pro Asp-Lys-Arg-Asp-Gly-Tyr Arg 545 550 555 560 Asp Val Arg Met Asn Tyr Asn Tyr Thr
 Glu Pro Thr Leu Ala Gly Asn 565570 575 Ala Gly Leu Val Ala Ala Leu Val Ala Leu Ser Gly Glu
 Glu Glu Ala 580 585 590 Thr Gly Lys Ile Asp Lys Asn Thr Ile Phe Ser Ala Val Pro Pro Leu 595
 600 605 Phe Pro Thr Pro Pro Pro Pro Ala Pro Trp Lys Pro 610 615 620 <210> 2 <211>
 2257<212> DNA<213> Arabidopsis thaliana <220> <221> CDS <222> (71) .. (1933) <400> 2
 gcacgagatc tgatcccaaa cctttgattc attgtgttg ttctctgctg ctttatcaga 60 gagcatcatc atg tac gga aga gat cca
 tgg gga ggt cca ttg gag ata 109 Met Tyr GlyArg Asp Pro Trp Gly Gly Pro Leu Glu Ile 1 5 10 aac
 act gca gat tcc gcc acc gac gat gat cgt agt cgg aat tta aac 157 Asn Thr Ala Asp Ser Ala Thr Asp
 Asp Asp Arg Ser Arg Asn Leu Asn 15 20 25 gat ttg gat cgt gcg gct ctt tca cgt cacta gat gag acg
 cag eag 205 Asp Leu Asp Arg Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Asp Glu Thr Gln Gln 30 35 40
 45agttgg tta ctt ggt cca acg gag cag aag aag aag tac gtc gat 253 Ser Trp Leu Leu Gly Pro Thr
 Glu Gln Lys Lys Lys Lys Tyr Val Asp 50 55 60 ctc ggt tgt att atcggt agc cgc aag atc ttc gtc tggact
 gtt ggt 301 Leu Gly Cys Ile Ile Val Ser Arg Lys Ile Phe Val Trp Thr Val Gly 65 70 75 act cttgtt gcc
 gcc gcg tta ctc gcc gga ttc att acc ttg atc gtt 349 Thr Leu Val Ala Ala Ala Leu Leu Ala Gly Phe Ile
 Thr Leu Ile Val 80 85 90 aaa act gtg ccgcgt cat cat cct aag act ccg ccg ccg gat aat tat 397 Lys Thr
 Val Pro Arg His His Pro-Lys-Thr-Pro-Pro Pro Asp Asn Tyr 95 100 105 act-ata-gct-cta-cac aaa-gct-
 ctt-aag-ttc ttc aat gct cag aaa tct 445 Thr Ile Ala Leu His Lys Ala-Leu-Lys-Phe-Phe Asn Ala Gln
 Lys Ser110 115 120 125ggg aaa ttg cca aag cat aat aac gtg tca tgg aga ggt aat tct ggg 493 Gly Lys
 Leu Pro Lys His Asn Asn Val Ser Trp Arg Gly Asn Ser Gly 130 135 140 ctt caa gat ggg aaa ggt
 gaa aca gga agc ttc tat aaa gat ttg gtg 541 Leu Gln Asp Gly Lys Gly Glu Thr Gly Ser Phe Tyr Lys
 Asp Leu Val 145 150 155 gga ggt tat tat gat gct ggt gat gct atc aag ttc aat ttc ccc atg 589 Gly Gly
 Tyr Tyr Asp Ala Gly Asp Ala Ile Lys Phe Asn Phe Pro Met 160 165 170gct tat gct atgact atg ttg
 agc tgg agt gtt att gaa tat agt gct 637 Ala Tyr Ala Met Thr Met Leu Ser Trp Ser Val Ile Glu Tyr Ser
 Ala 175 180 185 aaatac gaa gctgct ggt gag ctc act cat gtt aag gag ctt atc aaa 685 LysTyr Glu Ala
 Ala Gly Glu Leu Thr His Val Lys Glu Leu Ile Lys190 195 200 205 tgg gga act gattacttt ctc aag act
 ttc aat agt act gct gat tcc 733 Trp Gly Thr Asp Tyr Phe Leu Lys Thr Phe Asn Ser Thr Ala Asp Ser
 210 215 220 att gat gat ctt gtg tca cag gtt gga tca ggg aat act gat gat gga 781 IleAsp Asp Leu Val
 Ser Gln Val Gly Ser Gly Asn Thr Asp Asp Gly 225 230 235 aat aca gat cct aat gac cat tac tgt tgg
 atg cga cct gag gat atg 829 Asn Thr Asp Pro Asn Asp His Tyr Cys Trp Met Arg Pro Glu Asp Met
 240 245 250gac tat aaa aggcccc gtg act act tgt aat ggt gga tgt tcg gat ctc 877 Asp Tyr Lys Arg Pro
 Val Thr Thr Cys Asn Gly Gly Cys Ser Asp Leu 255 260 265 gctgca gag atggca gct gct ctg gct tca

gca tct att gta ttc aag 925 AlaAla Glu Met Ala Ala Ala Leu Ala Ser Ala Ser Ile Val Phe Lys270
 275 280 285 gat aac aag gaattattct aaa aag ctt gtc cat ggt gct aag gtg gtg 973 Asp Asn Ly s-Glu-Tyr-
 Ser-Lys-Lys Leu Val His Gly Ala-Lys-Val-Val 290 295 300 tat cag ttt gga agg acg agg aga ggg aga
 tat agt gca ggc act gcg 1021 Tyr Gln Phe Gly Arg Thr Arg Arg Gly Arg Tyr Ser Ala Gly Thr-Ala
 305 310 315 gaa tct agc aag ttctat aat tca agt atg tat tgg gat gag ttc att 1069 Glu Ser Ser Lys Phe
 Tyr Asn Ser Ser Met Tyr Trp Asp Glu Phe Ile 320 325 330 tgg ggt ggt gct tgg atg tattatgct acc gga
 aat gta acg tat ctc 1117 Trp Gly Gly Ala Trp Met Tyr Tyr Ala Thr Gly Asn Val Thr Tyr Leu 335
 340 345 aat cta atcacc caa cct act atg gcc aag cat gct ggt gcc ttc tgg 1165 Asn Leu Ile Thr Gln Pro
 Thr Met Ala Lys His Ala Gly Ala Phe Trp350 355 360 365ggt ggc cct tac tat ggtgtattt agc tgg gac
 aac aag ctt gct ggt 1213 Gly GlyPro Tyr Tyr Gly Val Phe Ser Trp Asp Asn Lys Leu Ala Gly 370
 375 380 gct cag ttgtctgtt agc cgg ttg agg ttg ttt ctg agt cct gga tat 1261 Ala Gln Leu Leu Leu Ser
 Arg Leu Arg Leu Phe Leu Ser Pro Gly Tyr 385 390 395 cca tat gaa gaa att cta agg acc ttc cac aat
 cag acc agc ata gtc 1309 Pro Tyr Glu Glu Ile Leu Arg Thr Phe His Asn Gln Thr Ser Ile Val 400
 405 410 atg tgc tca tacttg cct att ttc aac aaa ttt aac aga acc aat gga 1357 Met Cys Ser Tyr Leu Pro
 Ile Phe Asn Lys Phe Asn Arg Thr Asn Gly 415 420 425 ggt tta ata gag ttg aat cat gga gct cca cag
 ccg ctg caa tat tct 1405 Gly Leu Ile Glu Leu Asn His Gly Ala Pro Gln Pro Leu Gln Tyr Ser430 435
 440 445gta aat gca gct ttc tta gcg act cta tac agt gat tat ctg gat gct 1453 Val Asn Ala Ala Phe Leu
 Ala Thr Leu Tyr Ser Asp Tyr Leu Asp Ala 450 455 460 gct gat act cct gga tgg tac tgt gga cct aat
 ttc tat tgc aca agt 1501 Ala Asp Thr Pro Gly Trp Tyr Cys Gly Pro Asn Phe Tyr Ser Thr Ser 465
 470 475 gtg-cta-cgt-gac-ttt gct-aga-tcc-cag-att gat tat ata ctg ggt aaa 1549 Val Leu Arg Asp Phe
 Ala Arg-Ser-Gln-Ile-Asp Tyr Ile Leu Gly Lys 480 485 490 aaccct cgg aaa atg agt tat gtc gtt ggt ttt
 ggc aca aaa tac cca 1597 Asn Pro Arg Lys Met Ser Tyr Val Val Gly Phe Gly Thr Lys Tyr Pro 495
 500 505 aga cat gtgcat cac aga gga gct tgc ata ccc aag aac aaa gtc aag 1645 Arg His Val His His
 Arg Gly Ala Ser Ile Pro Lys Asn Lys Val Lys510 515 520 525tat aac tgc aaa gga gga tgg aaa tgg
 aga gac agc aag aaa cca aac 1693 Tyr Asn Cys Lys Gly Gly Trp Lys Trp Arg Asp Ser Lys Lys Pro
 Asn 530 535 540 cca aac acg att gaa gga gcc atg gtt gct ggt cct gac aag cgc gac 1741 Pro Asn Thr
 Ile Glu Gly Ala Met Val Ala Gly Pro Asp Lys Arg Asp 545 550 555 ggg tac cgt gat gtc cgt atg aac
 tac aac tac act gaa ccg act ctt 1789 Gly Tyr Arg Asp Val Arg Met Asn Tyr Asn Tyr Thr Glu Pro
 Thr Leu 560 565 570gca ggc aat gctggt cta gtc gca gct ctt gtg gca tta tgc ggt gaa 1837 Ala Gly Asn
 Ala Gly Leu Val Ala Ala Leu Val Ala Leu Ser Gly Glu 575 580 585 gaagaa gcc accggt aag ata gac
 aaa aac act att ttc tca gct gtt 1885 GluGlu Ala Thr Gly Lys Ile Asp Lys Asn Thr Ile Phe Ser Ala
 Val590 595 600 605 cct cct ttg ttccctact cca cca cct cca cca gca cca tgg aaa cct 1933 Pro Pro Leu
 Phe Pro Thr Pro Pro Pro Pro Ala Pro Trp Lys Pro 610 615 620 tgagaaagctagacttgtt gattctgtcg
 ctgctgccaa aaaaaatgaa tgaggtaaga 1993 aggatttggg tgtgagacca gaagattaga agctaaacac aagtcagcca
 taaccaaaact 2053 actaaggatt tcatttggct ttactagata caaacacgggtgggttact ttaccacaag 2113 cattgtcttt
 cttttctttt ttgggtgtc tgtttgttc ttgtgagata tcatatata 2173 ctatgcgttt tactctgtat atgttgata ccaaactgt
 attctttgat aaacaattta 2233 atgaactgta ttaactttt aact 2257 <210> 3 <211> 12319<212> DNA<213>
 Arabidopsis thaliana<220> <221> exon <222> (3447) .. (3819) <220 <221>> exon <222> ..
 (3898) (4208) <220 <221>> exon <222> .. (4282) (4746) <220 <221>> exon <222> .. (4863)
 (4998) <220><221> exon<222> (5100)..(5272)<220><221> exon<222> (5443)..(5850)<400>
 3ctcagagagt-tcattcttc-tccgtcttat-cgatatccct-ttgaacatg-ctacaagata 60tcatgtttgg cttggtcata tcaccatggc-
 ttctctcc ttacatggcc-tctgttatgt 120tgttgatgg atcattcaag gtcaactttt agagcttgta agatcctaca acatcattga
 180 atcttgacat aatagtatag cctagtttat ctactatagt atagtgtcga tcatcggttc 240 aagataggct tatactctat
 aagtcacaat tttatctct tttttctat tgtaaagttt 300 catcatcacc aactacttac tctctcaga tttttcatg gaatgctatc
 ggaattgcta 360 tcttaccggg agttatcagt ctagtggcgg gttactgat gtgggtcaca tcgcttcaca 420 ccgtgagaaa
 gaattacttt gagctctct tctacacaca tcaactatac atcgtcttta 480 ttgtgtctt ggcacttcac gttggtgatt acatgtttag
 tatagtgtct ggaggaatat 540 ttctttcat tctagaccgc ttcttgaggt tctgccaatc aagaaggact gttgatgtaa 600
 tctctgcaaa gagtttacct tgtggaactc ttgaactagt cttttcaaaa ccaccaagta 660 acaactctgt ttattctctg ttttacct
 ctaatctaaa acattactg actttttct 720 tcttcaatac cgcaaaaaac agatatgca tacaatgcgc ttactttat cttttcaa
 780 gtgagggaac tatcttggtt acaatggcat ccaatttagt ttcttcaag ccctctagat 840 gggaaccatc atgttgcggt
 tctcataaag gttcttggtg gatggactgc aaagcttaga 900 gaccagtgtt caaatctata cgaggcagag aaccaagatc
 agctcatttc tctcagtca 960 tatcctaaaa tcacaacttg tgtggaggga ccttatggcc atgaatctcc ataccattta 1020
 gcgtaatgca ttctgtctac ttgaaatttt tcaatgccca taagctttag ctttaactcaa 1080 gaaagattta ttgcgggtgc

aggtatgaga acctggtctt agtagcagga ggaatcgga 1140 ttacgccttt ttccgccatc ttaagcgata tcctacaccg
 taaaagagat gggaaagctt 1200 gtttacctag taaggtttta gtgtatggg ccattaaaaa ctcagacgag ctctctctgc 1260
 tctcagcaat tgacatacct tccatttggc ctttctctc taagaacta aaccttgaga 1320 ttcacatata tatcactcga
 caatccgagc ctgcttgggt acgtcttaaa taagtctttt 1380 gggagctgca ataggcctta ctaagcttgt tgaactctt
 aatgtttcat ggttatacag 1440 gaagatggga tgggtcaciaa ggtggtgcat ccttctgtca agctaccacg gaccaacgga 1500
 tgttctatgt cgttactagt tggtagagg gataacatat ggtctggact ctatctaatt 1560 atatccacca ttggatttat ttaaatgatc
 acattgttg acatctttta cataaaaaa 1620 tacaacataa caacgtgggt gtacaaggga cttctatttg ttggtgtat
 ggttgcaagt 1680 gtcttgatt ttggaggct tgtgtgtgt ttctggcatc gctgggaaca caaaaccggt 1740 gaagtgggaag
 caaatggcaa cgacaaggta gattgaatg gagaagaac ccataatcca 1800 tctgcagcag agcttaaggg cttggcaata
 gaagaagatg tccagaatta caccactatt 1860cgttatggca ccagaccg gc-cttagaggt-atcactaca aaattagcgg-
 tgcaagtc 1920agttatctcg ttttttatt tataaaatta-tagaaactga aatcattcgg-aacggttga 1980cacggttctg
 ttcggttctt gaatccgact-ttgggtgtag alatttggct-cgattcgggt 2040aagttaaate ttgattggt tcatgtaata-tttttattt
 gtaattgcag agataattga 2100 gtcattgaat gggaaatggg ggagtggtga tgtggagtg atagtatgag gtccagcgac 2160
 tcttcagacg accgtagcca aagaaatagc gtcacatagc atctggcgat cggcgaatca 2220 tctcttttc cacticaaca
 gccacagttt cgaatctaa cgaatcttcc aaggccaaag 2280 aacattatgg aaggaaatc gaagacaaat tgatgcatai
 attttagga atctctgtca 2340 gtatgtacta tggaacagc tatggtgat atgtgtatgt ttatcttca gtttctgat 2400
 tataaagtag aaatcaaatg tatgacatc tatggttct agttctacac ttgttggtgt 2460 ttctacattg gacatttaatt attaatata
 tgcaagctga taagtctat aattacatag 2520 ctgccatata attttcgaa tttttaaag tagagatata ttcatatata tatgagggat
 2580 tagattctat aattacgaat gtatttaatt tcaaaataa agttagattc tcaataatt 2640 ccttacttac tctgtgaggg
 attagagtcg taaaaatgac cacaagatgt aattttttt 2700 taggtcattg atctaccatc aattgtcgg acacacttat ctataagtt
 ttaaatttta 2760 acaaatgtaa gtgaaatttt gtgtagact atcattttca agtagaagta gaatttaagt 2820 aaccttctt
 gttataattt tttttaaaa attatgcat tacttagagc ccaccagaaa 2880 tgatgacgtg taaaacacca taatcataaa
 ggataaaata aaattatcat ccaccgaca 2940 gttattagc ggagatgtct ttttccatcc acccgacatt agcccatgac
 ttactagta 3000 aacaaagtat atgcaatttt ttgttagaaa aaacggtgca taaaaataa tattttaatg 3060 tctccgacaa
 attttaattg tatgaaaaat aaatacacia gattacaagt tggccaaaac 3120 gctcaatcat agttggccaa aaataacta
 ttccaaaatt agagtttagct gtaacgtaac 3180 atgtacaaat aaaccaaaca aaacatataa taacaaaata attgaagtga
 gttttaaaaa 3240 ggaaaaaaaa aaaagagtaa aaaccaaaca ccagatctct caaagagtct ttgtacatta 3300 ttgactagag
 agagcttttt agcttcacat ttcttcactt ccacacactt ttacttctt 3360 ctctctctc ttctctctc cagatctgat cccaaacctt
 tgattcattg ttgtgttct 3420 ctgctgcttt atcagagagc atcatc atg tac gga aga gat cca tgg gga ggt 3473 Met
 Tyr Gly Arg Asp Pro Trp Gly Gly 1 5 cca ttg gag ata aac act gca gat tcc gcc acc gac gat gat cgt agt
 3521 Pro Leu Glu Ile Asn Thr Ala Asp Ser Ala Thr Asp Asp Arg Ser 10 15 20 25 cgg-aat-tta-
 aac-gat ttg gat cgt gcg gct-ctt-tca-cgt-cca-cta-gat 3569Arg Asn Leu Asn Asp Leu Asp Arg Ala-
 Ala-Leu-Ser-Arg-Pro-Leu-Asp 30 35 40 gag acg cag cag agt tgg tta ctt ggt cca acg gag cag aag aag
 aag 3617 Glu Thr Gln Gln Ser Trp Leu Leu Gly Pro Thr Glu Gln Lys Lys Lys45 50 55 aag tac gtc
 gat ctc ggt tgaatt atc gtt agc cgc aag atc ttc gtc3665 LysTyr Val Asp Leu Gly Cys Ile Ile Val Ser
 Arg Lys Ile Phe Val 60 65 70 tgg act gttggt act ctt gtt gccgcc gcg tta ctc gcc gga ttc att 3713 Trp
 Thr Val Gly Thr Leu Val Ala Ala Ala Leu Leu Ala Gly Phe Ile 75 80 85 acc ttg atc gtt aaa act gtc
 ccg cgt cat cat cct aag act ccg ccg 3761 Thr Leu Ile Val Lys Thr Val ProArg His His Pro Lys Thr
 Pro Pro 90 95 100 105 ccg gat aat tat act ata gct cta cac aaa gct ctt aag ttc ttc aat 3809 Pro Asp Asn
 Tyr Thr Ile Ala Leu His Lys Ala Leu Lys Phe Phe Asn 110 115120 gct cag aaa t gtaagttag
 aatctacttagatctgataaaatttagata ta 3861Ala Gln Lys gagttttaga tctaagtctg attttgattg ttgtag ct ggg aaa
 ttg cca aag 3914 Ser Gly Lys Leu Pro Lys 125130 cat aat aac gtg tca tgg aga ggt aat tct ggg ctt caa
 gat ggg aaa 3962 His Asn Asn Val Ser Trp Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gln Asp Gly Lys 135 140
 145 ggt gaa aca gga agc ttc tat aaa gat ttg gtg ggaggt tat tat gat 4010 Gly Glu Thr Gly Ser Phe Tyr
 Lys Asp Leu Val Gly Gly Tyr Tyr Asp 150 155 160 gctggt gat gct atc aag ttc aat ttc ccc atg gct tat
 gct atg act 4058 Ala Gly Asp Ala Ile Lys PheAsn Phe Pro Met Ala Tyr Ala Met Thr 165 170 175
 atg ttg agc tgg agt gtt att gaa tat agt gct aaa tac gaagct gct 4106Met Leu Ser Trp Ser Val Ile Glu
 Tyr-Ser-Ala-Lys-Tyr-Glu-Ala-Ala 180 185 190 ggt-gag-ctc-act-cat gtt aag gag ctt atc-aaa-tgg-gga-
 act-gat-tac 4154Gly Glu Leu Thr His Val Lys Glu Leu Ile Lys Trp Gly Thr Asp Tyr 195 200 205
 210ttt ctc aag act ttc aat agt act gct gat tcc att gat gat ctt gtg 4202 Phe Leu Lys Thr Phe Asn Ser
 Thr Ala Asp Ser Ile Asp Asp LeuVal 215 220 225 tca cag gtacttgttt atgaccttcg taggagatcttcatattga
 gttgtttgtt 4258Ser Gln cactcgttac atgttaatg tag gtt gga tca ggg aat act gat gat gga aat 4311 Val Gly
 Ser Gly Asn Thr Asp Asp GlyAsn230 235 aca gat cct aat gac cat tac tgt tgg atg cga cct gag gat atg

gac 4359 Thr Asp Pro Asn Asp His Tyr Cys Trp Met Arg Pro Glu Asp Met Asp 240 245 250 tat
 aaa agg ccc gtg act act tgt aat ggt gga tgt tgc gatctc gct 4407 Tyr Lys Arg Pro Val Thr Thr Cys Asn
 Gly Gly Cys Ser AspLeu Ala 255 260 265 270 gca gag atg gca gct gct ctg gct tca gca tct att gta ttc
 aag gat 4455 Ala Glu Met Ala Ala Ala Leu Ala Ser AlaSer Ile Val Phe Lys Asp 275 280 285 aac
 aag gaa tat tct aaa aag ctt gtc cat ggt gct aaggtg gtg tat 4503 Asn Lys Glu Tyr Ser Lys Lys Leu Val
 His Gly Ala Lys Val Val Tyr 290 295 300 cag ttt gga agg acg aggagaggg aga tat agt gca ggc act
 gcg gaa 4551 Gln Phe Gly Arg Thr Arg ArgGly Arg Tyr Ser Ala Gly Thr Ala Glu 305 310 315 tct
 agc aag ttc tat aat tca agt atg tattgg gat gag ttc att tgg 4599 Ser Ser Lys Phe Tyr Asn Ser Ser Met
 Tyr Trp Asp GluPhe Ile Trp 320 325 330 ggtggt gct tgg atg tat tat gct acc gga aat gta acg tat ctc aat
 4647 Gly Gly Ala Trp Met Tyr Tyr Ala ThrGly Asn Val Thr Tyr Leu Asn 335 340 345 350 cta-
 atc-acc-caa-cct act atg gcc aag cat-gct-ggt-gcc-ttc-tgg-ggt 4695Leu Ile Thr Gln Pro Thr Met Ala
 Lys-His-Ala-Gly-Ala-Phe-Trp-Gly 355 360 365 ggc cct tac tat ggt gta ttt agc tgg gac aac aag ctt
 gct ggt gct 4743 Gly Pro Tyr Tyr Gly Val Phe Ser Trp Asp Asn Lys Leu Ala Gly Ala 370 375 380
 caggtcagtcac acataacaac ctgctgtgtt tatgtttctt agatattcat 4796Gln(s) gtcttctga tcaattgcct taaccatact
 actcttgact cttttgaatc ctttttgcga 4856 ttttag ttg ctg ttg agc cgg ttg agg ttg ttt ctg agt cct gga tat 4904
 Leu Leu Leu Ser Arg Leu Arg Leu Phe Leu Ser Pro Gly Tyr 385 390 395 cca tat gaa gaa att cta agg
 acc ttc cac aat cag acc agc ata gtc 4952 Pro Tyr Glu Glu Ile Leu Arg Thr Phe His Asn Gln Thr Ser
 Ile Val 400 405 410 atgtgc tca tac ttg cct att ttc aac aaa ttt aac aga acc aat g gt 5000 Met Cys Ser
 Tyr Leu Pro Ile Phe Asn Lys Phe Asn Arg Thr Asn 415 420 425 tagttacctt ccagctttaa
 tgtctgcctctaataaaaact ccaactgtggggtgttct 5060 tgtttcagat atctaaaatg aaatctttgg tatgtgcag ga ggt tta
 ata gag ttg 5116 Gly Gly Leu Ile Glu Leu 430 aat cat gga gct cca cag ccg ctg caa tat tct gta aat gca
 gct ttc 5164 Asn His Gly Ala Pro Gln Pro Leu Gln Tyr Ser Val Asn Ala Ala Phe 435 440 445 450
 tta gcg act cta tac agt gat tat ctg gat gct gct gat act cct gga 5212 Leu Ala Thr Leu Tyr Ser Asp Tyr
 Leu Asp Ala Ala Asp Thr Pro Gly 455 460 465 tggtag tgt gga cct aat ttc tat tgc aca agt gtg cta cgt
 gac ttt 5260Trp Tyr Cys Gly Pro Asn Phe Tyr Ser-Thr-Ser-Val-Leu-Arg-Asp-Phe 470 475 480 gct-
 aga-tcc-cag-gtattgctt ttttcttta ctctttacag-aaatgtaat 5312Ala Arg Ser Gln 485 ctcagatata
 gtaatggata agatccaaaa atgacacttt taaccaagat gtacgaaga 5372 tctttttaa ctccattttttatttgaca tctaaatgg
 atttaactcg gccttgctgt5432 attttggcag att gat tat ata ctg ggt aaa aac cct cgg aaa atg agt 5481 Ile Asp
 Tyr Ile Leu Gly Lys Asn Pro Arg Lys Met Ser 490 495 tat gtc gtt ggt ttt ggc aca aaa tac cca aga cat
 gtg cat cac aga 5529 Tyr Val Val Gly Phe Gly Thr Lys Tyr Pro Arg His Val His His Arg 500 505
 510 515 ggagct tgc atacc aag aac aaa gtc aag tat aac tgc aaa gga gga 5577 Gly Ala Ser Ile Pro Lys
 Asn Lys Val Lys Tyr Asn Cys Lys Gly Gly 520 525 530 tggaaatgg aga gac agc aag aaa cca aac cca
 aac acg att gaa gga 5625 Trp Lys Trp Arg Asp Ser Lys LysPro Asn Pro Asn Thr Ile Glu Gly 535
 540 545 gccatg gtt gct ggt cct gac aag cgc gac ggg tac cgt gat gtc cgt 5673 Ala Met Val Ala Gly
 Pro Asp Lys Arg Asp Gly Tyr ArgAsp Val Arg 550 555 560 atgaac tac aac tacact gaa ccg act ctt
 gca ggc aat gct ggt cta 5721 Met Asn Tyr Asn Tyr Thr Glu Pro Thr Leu Ala Gly Asn Ala Gly Leu
 565 570 575 gtgcga gct ctt gtg gca tta tgc ggt gaagaagaa gcc acc ggt aag 5769 Val Ala Ala Leu Val
 Ala Leu Ser Gly Glu Glu Glu AlaThr Gly Lys 580 585 590 595 ata gac aaa aac act att ttc tcagct gtt
 cct cct ttg ttc cct act 5817 Ile Asp Lys Asn Thr Ile Phe Ser Ala ValPro Pro Leu Phe Pro Thr 600
 605 610 cca cca cct cca cca gca cca tgg aaa cct tgagaaagct agacttgt5867 Pro Pro Pro Pro Pro Ala
 Pro Trp Lys Pro 615 620 gattctgtcg-ctgctgccaa aaaaaatgaa-tgaggaaga aggatttggg-tgtgagacca
 5927gaagattaga agctaaacac aagtcagcca-taaccaaact actaaggatt-tcatttgct 5987ttactagata caaacacggg
 gtgggttact-ttaccacaag cattgtcttt-cttttcttt 6047tttgggttgc tgtttgttc ttgtgagata tcatatata ctatgcgtt
 tactctgtat 6107 atgtttgata ccaaacttgt attctttgat aaacaattta atgaactgta ttaaactttt 6167 aactatgtt
 tatttgcaa gtgtgagatc aacctggaat aacaactgta gtctactaaa 6227 atacgtgatt ctagcatgca ttactcaat
 taatggatat aaacgatgat gcagaaagaa 6287 tattgcagta aagaacggaa ttacatatgg cattctttat acatgatgaa
 gttgtattca 6347 cagagatcat ggagaaaccc aaattaaact gtatcacag tacacaggcg agatgtgttc 6407 gagaaggcgt
 catcgtaaat caaacgagct tcgatattac atgacatgac gcccaaaagg 6467 cctttgatgc aaccctcagg atcacggggt
 ttgatagat cctgtcgggt aatatgaaca 6527 aataaaaaatg ctgtgtgaga acgataaaca atgggactat tagattttgc
 aatgtagaag 6587 atgactagat gatattatac cctataacag ttgcgtcca tgacgtacg ttgtaagcaa 6647 ccttactcc
 atcccaggct tccgaagt tcccctttct attcttact gagaacatcc 6707 tgctaagtgc tacattacaa ttaaacact
 aatgttacag ttttactact aatctgatat 6767 gccaccactg atcaacttca cacataatca acatcaaga aaataactg
 gcgacttaat 6827 ggtctttgtt tgtgtcagcg caataacaag ctctcagtt gagttttaag attggaaccg 6887 gtaaaccta

ttcttactg aattgtagaa cacatatcta accacagaat aatctatgga 6947 tgaatccttg agcctccccct acttctctat
 gccctctcaa accccaaaac cgattcccaa 7007 gaacaatcaa tgccttttac cagtctgtcc aatgccgtat ttctctaaa
 gatctatctg 7067 ttctgaattt gagggttagc aacagtgacg tggctattat gttacagcca actattatgt 7127 ctacttatca
 ttgagatata cagcatttga aggttgacag aagagtcgag aataccttct 7187 tgaagctgct caggagtcaa gtccctgcaca
 atgatggcaa ctgtataaa ctcaaatgaa 7247 aggctgatat acaatgaaca aattataacg aaagttaaga cttagatatac
 ctttctctgc 7307 ttaagtgaat gtaataagt agccatgaaa catgcaatgc cctctgctat atcttcttct 7367 ctaacaagga
 cataatcttc ttcccttga gccatgggtt catcatccca aagatcatct 7427 tcactaacta catcccaaga gctactatct
 tctaaaacac cagaaatcac aatcatctat 7487 acaaccaatg agcaaacagg cttaaaaaaa acattatagt cctcaccagc
 aagatgttgc 7547 ggcgctgaaa cctgggctga ctcaatctt tcaaggaagt catcacatc aaccctggat 7607 ttgatgagat
 catataactg aaacaaggaa gaagaaagtc atgacattat tgtatcata 7667 caaacatatg acgcatcatt ataaaatgtt
 gatgtatata cattaccaa aattcaacgc 7727 acacttatt gataaaciaa aagttccgaa cttaaagct tgaagcaaat
 ttctctaca 7787 attctcttc agagagatgc atatacttac tcatcagct tcagatctt ctgctcga 7847 agaagaaact
 tctccctgc tctcttga cccactc cc-tcgccggtgc-tttatcatc 7907ttcatcgtct tcagaactga ctccgctaa-
 gtttaataac tcgagggctc-tctggcaatc 7967attgagcaaa gcttgcaaaag tticcgtt-gacacgaata ttatcttat-
 cgattcgtt 8027tcttctgcgc tctgtattgt tatcatggt-attgggtatt acccaatcct-cagagaggat 8087acaatcgaag
 ctcttgcgcg atagaatcct ttgaagaaca agatctgaga agacgacgac 8147 tgatcgatcg ttgtgtcgc gcaattctc
 ttcttctgt ttgtttgt ttgttttca 8207 cgtataaaa aaaaaatgga gttttgttt attatgtgtg agctgtgacg tgaactaat
 8267 tggttttta aacaagatt ttgacattg gttgtctt ctctacgaa ttgctatgt 8327 attaaaaaa gttcaciaa
 actattacta tagtataatc ttttggaca gagaccataa 8387 ttgagaaagc agaagaaata ataacttgc ttctgtgc ttatcgaata
 aattgggtcg 8447 ggccttgaga ttttatctt ttgttctg ggggtgggt ttgtgagaga catctacatg 8507 ggttggaaac
 ttggaggct tgaggtaat ttgtgatt tttttgaa ggaccaacta 8567 tgattatatt catataatt ccccaatcaa ttgatcatt
 atggattaca cgtattaagt 8627 catcttatt taattttag catttagtt actttagatt ttacttga attaccatt 8687
 gattgaattc ttctacat tcttctgga ttacttga tatgaatagg ggttgaattc 8747 ttattgtaa catctacca acaatttgc
 ataacaagag catttatccg aacgactatc 8807 ttgactcctc gactattta gaagattat cattgatatt ttatccact ctttgcgt
 8867 tttttacat tccagtatt ttactctta aggttaatt atatatctga tgatagtact 8927 agactcgtt ttcataaatt
 taccttctg gactatgtc ccccggttg ggataatcgg 8987 aattaatcat tttgggtct attctaattg aaacataatt agtagatac
 tgatagatc 9047 aaataaaat atatacttat tattatttta tatggctgat gtcaaaaaag gaaaggaaaa 9107 tggacatcca
 aaaagaaaag gttgtcgaat ttatgtcag ttcttctc ctctctgaa 9167 gttcaaacc caaacccca tgtaaaaaa
 gcgagagggc actgaaaaga caagtggga 9227 ttgaatgtt ttatatatat agatatgtt gttttgcag acattgcagt
 tgatagtct 9287 tgaacttct ggatatatga gagagaccag ggacatgaat ccaaacatca agacacatc 9347 agacaaagcc
 aaacagtatc ccatcaatgc ttcacgacca cgtatatga tagttattgt 9407 ctttttga ccagtatct ggatagtat tctctttt
 tgaacttata aacacaaaaa 9467 caaatcgcg ctctctcag gagtagtcat actgcatct tattaacatg ttatcttt 9527
 tggtaagtc tatgacatt tttaataaa tacatacgag taattggaaa gaaaagcaat 9587 tgtgcaaac tgtgatga
 cgaacgattc gtacatttt tacttttgt atttaactgt 9647 tatgggaaca aaaagtatat ggtaaatgcc gccaaaattg taagggtgat
 ggtgtagtag 9707 aggataaagt agccgcctt ctgagaagc agtcaaatat tgggtgtgga agacaagaat 9767 agccagctt
 cttaaacgtt atagctaatt gctacgtatt aattatacca catttgaag 9827 atccaataaa gaagcataat tgtacaataa
 gagtattaaa atgaaaaca tcattagaga 9887 taaatttta aatttctca gaatatgatt gaagacactt ggaagcatat
 ttatatagt 9947 caaatcaat taattcgcga acaagctaaa gaaaaccata aacccaaggt t tgagagaga
 10007ttacaccgtg gaaagatatg-tcaattctga taaaaaata-aatctaat agataaaaaa 10067gcaaacgatt
 ctcatgatc-aaaagcaaaa aaaaaaac-ctagtttctt gattcatct 10127aacacaaaac aaaaaaac-aaaaaagaa
 agaaagagat-ttgtgaaag aggattggt 10187agtatggcg tggagctctg gctgtagggg ccaataaac atcagagcca
 cccatgtgc 10247aactgtatc tgatcccca cagactctc ctccactcc cgccatctgt cctgactctt 10307caccgccacc
 agagaccggc ggagattgtc cctctcttc cctgtcccc gccagtggt 10367ttgtcttc ttccgccgtt aaccggtgat
 aagaagggtt gttgaaactt gcggcgatga 10427cgtaactgt tctgccgaa ataagtggac cagcgacgaa cctccgatg
 atttctctt 10487gaggtccagc gagagagacg gtgaagaagt tagaacggg aggagacaag gaagtacgag
 10547gcggaggagg gagaacgtt gcggagacgg agaggagatc aaacttcca tggaaagta 10607tggtagagcc
 aagagctgcc ggtgatggct gacgtaaagt gacgttagct acagagccag 10667agccactaag gacgcagact ccgatggatt
 tacggcgga gaaacggtt atggctcga 10727cgagctgt tctgaagga acttcgagga tgaaggact cataggaggg
 tgggtgcac 10787gtgtacgaa gacgggtgtt ttggttct tttggaacc tgggtgtctg ccacgtggac
 10847gtcgaccac ttgatggag gattcatcga cgggtgggt tacgggtgag gagaggtgga 10907agtgaggtt
 aagagagtgt tgtgttgtt gttgtgtg ttgtgtga tgataggaa 10967gcttgaaaa catttctt ctcttctt ctctgtattc
 accttctc ttgtttt 11027ttatttatg gattgttta ttagagatt cagatttgc ttggattt tgtgaaatg
 11087atttaaaaaa aaaaaaaag aggaggaaga agaagaaga gatgtagagg ttgtggtat 11147ggggtgaata

aagagatgat agaggagagg gacttttcgt aaatcccttt gggaaatggt 11207atggtgtata aagtataaaa tggaagaagta
 ttgcttatt tgttttaatt attattaaaa 11267gaaatggttt tgttttctat aaaaagaaaa aaagagaaat gagaggatag
 ggaagaagga 11327agatgagctt tgaaagcaag aaaagagagc ggcgccgcta gttggaatt gcaagtgaag
 11387aaaacaaaat acgtgtcttt ttgtgtggg ttcacactct ctctctttt tttttaata 11447aagtttttg gttcaaaacta
 tattataata tagtattga tcaaaacttc gtctattaca 11507aaaatataat actttatgaa agtttttta gaatacagta tcaacgacat
 aaaatttaa 11567tttttttt ttttaagt gacttgctat atagtcattg gatagtga attattcta 11627aaacctgatt
 tgattagtga tgcagagaga aaaaaaagat agggaggaga caagtgggga 11687atggatgatg agagagggag agggacatcc
 cccatttccc aaatctggag tgtgctatga 11747atcaattcgg tctcttcac atctctctg ttggcctcat ttcactctt ttaagttta
 11807tcttctctc ctctcatcatt attacttat ccatgttact atttggttaa cactatacaa 11867tcatctacc aactgtccgt
 caacgctatt cgtttcaat atcattttt tctcttgga 11927actatttta aaaattgaa tatcttcca cgaaaaacat atcatttg
 gtaaggttg 11987ttgtaatgca tgcaggactg aatgatgat acatataaat tgaataaat tgatagtat 12047 agttataaac
 ttaacgaaat ctaatttgcg gtttaggtt aaaataacat aaattacg t 12107atgattttt ctttctttt-tggtcaaca-acaaaattaa-
 actaatatct attcatgaa 12167tattccttc tacatcacgt agtgatagc-taactaggat tccataatat-atgtgatag
 12227tccatgctt attgaagatg tgcagagaat aacaaaaatg gtcgacaaga gagaagaagt 12287tatgcacgta
 gccatgttc-catggctagc ta 12319 <210> 4 <211> 28<212> DNA <213> Arabidopsis thaliana<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially Synthesized Primer Sequence <400> 4
 tcaaatagat atatgtaata tgttcgc 28 <210> 5 <211> 28<212> DNA <213> Arabidopsis thaliana<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially Synthesized Primer Sequence <400> 5
 caataaataa ttatacaaaa ctttcaag 28 <210> 6 <211> 25<212> DNA <213> Arabidopsis thaliana<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially Synthesized Primer Sequence <400> 6
 tacttaataa agtaggataa tgtcg 25 <210> 7 <211> 25<212> DNA <213> Arabidopsis thaliana<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially Synthesized Primer Sequence <400> 7
 gaacatgaat tcatgtgta cactg 25 <210> 8 <211> 28<212> DNA <213> Arabidopsis thaliana<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially Synthesized Primer Sequence <400> 8
 gcttataaat ggtataaac ctatcagc 28 <210> 9 <211> 28<212> DNA <213> Arabidopsis
 thaliana<220> <223> Description of Artificial Sequence:Artificially Synthesized Primer Sequence
 <400> 9 tgcctaattc tccggaaca ttaccggc 28

[Translation done.]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.